

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

TALÍA DA COSTA

**CRESCIMENTO *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E
CONTEÚDO DE DIOSGENINA DE DIFERENTES
SOMACLONES DE *Dioscorea composita* HEMSL.
(DIOSCOREACEAE)**

FLORIANÓPOLIS, SC

2006

TALÍA DA COSTA

**CRESCIMENTO *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E
CONTEÚDO DE DIOSGENINA DE DIFERENTES
SOMACLONES DE *Dioscorea composita* HEMSL.
(DIOSCOREACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dra. Ana Maria Viana
Co-orientador: Dr. Edison Paulo Chu

FLORIANÓPOLIS, SC

2006

Costa, Talía da

Crescimento *in vitro*, aclimatização e conteúdo de diosgenina de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* Hemsl. (Dioscoreaceae). / Florianópolis, 2006.
f. 150; grafs, tabs, il.

Orientadora: Dra. Ana Maria Viana

Co-orientador: Dr. Edison Paulo Chu

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.
Bibliografia: f. 150.

1. *Dioscorea composita*; 2. Cultura *in vitro*; 3. Microtubérculos; 4. Crescimento; 5. Diosgenina; 6. Carboidratos.

TALÍA DA COSTA

**CRESCIMENTO *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E CONTEÚDO DE DIOSGENINA
DE DIFERENTES SOMACLONES DE *Dioscorea composita* HEMSL.
(DIOSCOREACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Prof. Dra. Ana Maria Viana
Orientadora/ CCB–UFSC

Prof. Dr. Edison Paulo Chu
Co-orientador/ Instituto de Botânica, SP

Prof. Dra. Vetúria Lopes de Oliveira
Avaliadora/ CCB–UFSC

Prof. Dr. Gilmar Roberto Zaffari
Avaliador/ CTTMAR–UNIVALI/ EPAGRI

Prof. Dr. Ênio Pedrotti
Suplente/ CCA-UFSC

FLORIANÓPOLIS, SC

2006

Ao meu pai Liba e
minha mãe Zequinha
por serem minhas fontes
inspiradoras e por todo o amor,

Dedico.

De coração agradeço

A Deus, por tudo o que é de mais sagrado;

Aos meus pais, Libório da Costa e Maria José Vieira da Costa pela oportunidade do estudo, por acreditarem sempre em mim apoiando-me em todas as minhas decisões, por superarmos juntos a distância física desses dois anos, pela amizade e por todo o amor oferecido, base de nossa relação;

À família “da Costa Saraiva”: minha irmã Taísa pela energia contagiante que ela irradia, por todas as nossas conversas e também por me hospedar tantas vezes lá em São Paulo. Meu cunhado Fernando por tantas idas e vindas ao Instituto de Botânica em São Paulo conseguindo fazer do trânsito algo irrelevante diante de tanta conversa boa e a minha sobrinha Maria Paula (2 aninhos!) pelos seus sorridentes pedidos irrecusáveis (“Quer jogar bola Tati? Quer, né?”) que me fizeram ver o mundo maravilhoso que tinha lá fora;

A toda a minha família que me apoiou nesta nova etapa de minha vida e que soube reclamar com carinho a minha ausência, especialmente à tia Nida pelas palavras amigas, principalmente nesta fase de finalização da dissertação e à tia Lila pelos domingos de oração;

Às amigas que fiz durante esses dois anos de mestrado, as quais me proporcionaram crescimento profissional e pessoal diante dessa diversificação de regionalidades, em especial à Deisy Regina Tres por compartilhar momentos maravilhosos, mostrando-me sempre o lado positivo de tudo o que acontece, por virar madrugada estudando comigo e por ficar analisando experimento noite adentro e também em alguns sábados de sol, e a Daniela Viviani pelas longas conversas no laboratório, pelo sorriso constante e pelo auxílio (tabelas, contagens, saquinhos... ufa!) fundamental, tornando divertido nossos dias de trabalho;

À profª Dra. Ana Maria Viana pelo aceite da orientação;

Ao prof^o Dr. Edison Paulo Chu pela co-orientação, pela disponibilização de recursos para o desenvolvimento de parte da dissertação, além do incentivo pessoal presente nas mensagens trocadas por e-mail;

À prof^a Dra. Áurea Maria Randi por todas as nossas conversas;

À prof^a Dra. Marisa Santos e à amiga Tagiane Arioli pelo auxílio e disponibilização de material para a realização das análises anatômicas;

À prof^a Dra. Vetúria Lopes de Oliveira por ceder tão gentilmente a casa de vegetação, possibilitando dar continuidade aos experimentos;

Aos funcionários e aos amigos do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, que colaboraram em parte das atividades laboratoriais, em especial aos amigos do “alojas BBB” que fizeram do meu dia-a-dia, no alojamento, algo extremamente especial;

À Vera Lucia de Mello Araújo Zapelini, secretária do curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pela disposição em prestar todo e qualquer tipo de serviço com a graça de sempre e

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Coragem e Fé Representam Metade do
Caminho da Vitória.
Determinação, Esforço e Perseverança
Completam o Resto do Caminho”*

Masaharu Taniguchi

CRESCIMENTO *IN VITRO*, ACLIMATIZAÇÃO E CONTEÚDO DE DIOSGENINA DE
DIFERENTES SOMACLONES DE *Dioscorea composita* HEMSL. (DIOSCOREACEAE)

RESUMO

As populações naturais de *Dioscorea composita* Hemsl. estão se tornando raras, devido ao extrativismo predatório ocasionado pela importância da diosgenina como precursor de compostos esteroidais. Plantas de cinco somaclones (S1, S2, S3, S4, S5), regeneradas a partir de um calo, produzido pela cultura de embrião zigótico, foram analisadas quanto ao crescimento *in vitro* e conteúdo de carboidratos e de diosgenina em diferentes condições de cultivo e após a aclimatização. Ramos foram formados em todos os somaclones na primeira semana de cultivo, na ausência de reguladores de crescimento. A rizogênese iniciou-se a partir da segunda semana e aumentou até a última semana de cultivo. O somaclone S4 apresentou a maior percentagem de formação de ramos e de raízes e o S2 a menor. Provavelmente como consequência, as plantas deste somaclone apresentaram a menor percentagem de sobrevivência durante a aclimatização. Visando avaliar o efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento dos somaclones, 5 μM de auxinas (ANA e AIB), citocininas (BAP e 2iP) e giberelina (GA_3) foram adicionados ao meio de cultura. As citocininas e GA_3 inibiram o crescimento da parte aérea de alguns somaclones. Todos os reguladores de crescimento foram eficientes em promover o crescimento dos microtubérculos, mas o somaclone S2 apresentou o maior incremento na presença de auxinas e citocininas. Na presença de GA_3 , o mesmo resultado foi observado para S5. O ANA aumentou o sistema radicular nos somaclones. Diferentes concentrações de GA_3 não induziram diferenças nas massas secas dos microtubérculos, mas reduziram a percentagem de formação de microtubérculos pequenos e aumentaram as percentagens de microtubérculos maiores que 201mg. Para obter maior proporção de microtubérculos com massa seca superior a 201 mg o tempo de permanência das plantas, em meio de cultura contendo GA_3 , foi de 15 e 30 dias para o somaclone S1 e 15 dias para o S4. Para o melhor crescimento da parte aérea, esses tempos foram de 30 e 45 dias para S1, não influenciando o S4. A combinação do GA_3 com diferentes concentrações de ANA aumentou a senescência dos somaclones, especialmente na presença de 5 μM , não aumentou a massa seca dos microtubérculos, mas aumentou a proporção de microtubérculos com massa seca maior. A presença de 2,73 mM e 4,10 mM de glutamina e 5 μM de GA_3 não promoveu o aumento da massa seca da parte aérea ou dos microtubérculos, contudo aumentou a proporção de microtubérculos com massas secas superiores a 100 mg. Em todos os somaclones diosgenina e colesterol estiveram presentes. O conteúdo de diosgenina dos tubérculos das plantas aclimatizadas foi maior no somaclone S3, que apresentou também maior conteúdo de carboidratos. Para as plantas cultivadas *in vitro*, o conteúdo de diosgenina foi maior nos microtubérculos das plantas cultivadas com GA_3 e na parte aérea das plantas cultivadas com ANA. Entretanto, o maior conteúdo de carboidratos foi observado na presença de auxinas.

Palavras-chave: *Dioscorea composita*, cultura *in vitro*, microtubérculos, crescimento, diosgenina, carboidratos.

IN VITRO GROWTH, ACCLIMATIZATION AND DIOSGENIN CONTENT OF
DIFFERENT SOMACLONES OF *Dioscorea composita* HEMSL. (DIOSCOREACEAE)

ABSTRACT

Natural populations of *Dioscorea composita* Hemsl. are becoming rare due to the predatory exploration caused by the importance of the diosgenin as precursor of steroidal compounds. Plants of five somaclones (S1, S2, S3, S4, S5), regenerated from one callus, produced by zygotic embryo culture were analyzed concerning their *in vitro* growth, carbohydrate and diosgenin content under different culture conditions and after acclimatization. Shoots were formed in all somaclones in the first week of culture in the absence of growth regulators. Rhizogenesis started in the second week and increased until the last week of culture. Somaclone S4 showed the highest percentage of shoots and roots and S2 the smallest. Probably as a consequence the plants of somaclone S2 showed the smallest survival percentage during acclimatization. Aiming to assess the effect of growth regulators on growth of the somaclones 5 μ M auxins (NAA and IBA), cytokinins (BAP and 2iP) and gibberellin (GA₃) were added to the culture medium. Cytokinins and GA₃ inhibited the growth of the aerial parts of some somaclones. All growth regulators were efficient to promote the microtuber growth but somaclone S2 showed the largest increment in the presence of auxins and cytokinins. In the presence of GA₃, the same result was observed for S5. NAA increased the root system of the somaclones. Different concentration of GA₃ did not induce differences in the microtuber dry masses, but was necessary to reduce the percentage of formation of smaller microtubers and increased the percentage of microtubers larger than 201 mg. To obtain the higher proportion of microtubers with dry mass superior than 201 mg the time of permanence of plants in the culture medium with GA₃ was of 15 and 30 days for somaclone S1 and 15 days for S4. For the best growth of the aerial part, those times were of 30 and 45 days for S1, not influencing the S4. The combination of GA₃ with different concentration of NAA increased the somaclones senescence, especially in the presence of 5 μ M, did not increase the microtubers dry mass, but increased the proportion of microtubers with the largest dry mass. The presence 2.73 mM and 4.10 mM of glutamine and 5 μ M of GA₃ did not promote neither the aerial dry mass or the microtuber dry mass, however increased the proportion of microtubers dry masses higher than 100 mg. In all somaclones diosgenin and cholesterol were present. The content of diosgenin in tubers of acclimatized plants was higher in the somaclone S3 which also had the higher carbohydrate content. For the *in vitro* grown plants the diosgenin content was higher in the microtuber of plants cultured with GA₃ and in the aerial part of plants cultured with NAA. However, the higher carbohydrate content was observed in the presence of auxins.

Keywords: *Dioscorea composita*, *in vitro* culture, microtuber, growth, diosgenin, carbohydrate.

SUMARIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
OBJETIVO GERAL:	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	3
1. CAPÍTULO 1	4
1.1. REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1.1 Características da Família Dioscoreaceae	4
1.1.2. Importância medicinal e atividades biológicas do gênero <i>Dioscorea</i>	6
1.1.3. Importância da aplicação de técnicas de culturas de células, tecidos e órgãos na multiplicação <i>in vitro</i>	9
1.1.4. Importância da aplicação de técnicas de culturas de células, tecidos e órgãos na produção de diosgenina	12
1.1.5. Importância da indução de microtubérculos do gênero <i>Dioscorea</i> em sistemas de cultura <i>in vitro</i>	16
2. CAPÍTULO 2	19
MORFOGÊNESE, CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE SOMACLONES DE <i>D. composita</i> NA AUSÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO	19
2.1. INTRODUÇÃO	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1. Origem do material vegetal e manutenção dos estoques dos diferentes somaclones de <i>D. composita</i>	20
2.2.2. Crescimento <i>in vitro</i> dos diferentes somaclones	21
2.2.3. Aclimatização de plantas dos diferentes somaclones	22
2.2.3.1. Aclimatização de plantas em bandejas plásticas em câmara de crescimento	22
2.2.3.2. Aclimatização de plantas em copos plásticos em câmara de crescimento	23
2.2.3.3. Aclimatização em vasos de 2,5 L em casa de vegetação	23
2.2.4. Determinação da massa seca das plantas	24
2.2.5. Determinação da densidade estomática e das dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos dos somaclones S2 e S4	24
2.2.6. Análise estatística	25
2.3. RESULTADOS	26
2.3.1. Morfogênese <i>in vitro</i> de segmentos nodais caulinares de diferentes somaclones	26
2.3.2. Aclimatização de plantas dos diferentes somaclones	30
2.3.2.1. Análise da sobrevivência das plantas em câmara de crescimento	30
2.3.2.2. Análise da sobrevivência e do crescimento das plantas após a transferência para a casa de vegetação	32
2.3.3. Determinação da densidade estomática, das dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos dos somaclones S2 e S4	34
2.4. DISCUSSÃO	34
2.5. CONCLUSÕES	42
3. CAPÍTULO 3	44
MORFOGÊNESE E CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE SOMACLONES DE <i>D. composita</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO.	44

3.1. INTRODUÇÃO.....	44
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.2.1. Origem do material vegetal e manutenção dos estoques dos diferentes somaclones de <i>D. composita</i>	45
3.2.2. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	46
3.2.3. Determinação da massa seca das plantas	47
3.2.4. Análise estatística.....	48
3.3. RESULTADOS	48
3.3.1. Efeito dos reguladores de crescimento sobre a morfogênese das plantas dos diferentes somaclones	48
3.3.2. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento dos microtubérculos	50
3.3.3. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento dos bulbilhos aéreos	59
3.3.4. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas	60
3.4. DISCUSSÃO	68
3.5. CONCLUSÕES	73
4. CAPÍTULO 4	75
EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO, ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E GLUTAMINA SOBRE A MORFOGÊNESE E CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE SOMACLONES DE <i>D. composita</i> Hemsl.	
4.1. INTRODUÇÃO.....	75
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
4.2.1. Origem do material vegetal e manutenção dos estoques dos diferentes somaclones de <i>D. composita</i>	77
4.2.2. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	77
4.2.3. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	78
4.2.4. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	78
4.2.5. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	79
4.2.6. Determinação da massa seca das plantas	80
4.2.7. Análise estatística.....	80
4.3. RESULTADOS	80
4.3.1. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	81
4.3.1.1. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre a morfogênese das plantas	81
4.3.1.2. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre o crescimento dos microtubérculos.....	82
4.3.1.3. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas	86
4.3.2. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	90
4.3.2. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	91
4.3.2.1. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese das plantas.....	91

4.3.2.2. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a o crescimento dos microtubérculos	92
4.3.2.3. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas.....	97
4.3.3. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre a morfogênese e o crescimento <i>in vitro</i>	99
4.3.3.1. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre a morfogênese das plantas.....	99
4.3.3.2. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre o crescimento dos microtubérculos.....	101
4.3.3.3. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas.....	104
4.3.4. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a morfogênese das plantas e o crescimento <i>in vitro</i>	107
4.3.4.1. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a morfogênese das plantas e o crescimento dos microtubérculos	107
4.3.4.2. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas.....	110
4.4. DISCUSSÃO	111
4.5. CONCLUSÕES	117
5. CAPÍTULO 5	119
ANÁLISE BIOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE DIOSGENINA DOS SOMACLONES DE <i>D. composita</i>	119
5.1. INTRODUÇÃO.....	119
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	121
5.2.1. Condições de cultivo	121
5.2.2. Análise bioquímica de carboidratos solúveis e amido	122
5.2.3. Quantificação de diosgenina	123
5.3. RESULTADOS	124
5.3.1. Análises bioquímicas de carboidratos solúveis e amido	124
5.3.2. Quantificação de diosgenina	125
5.4. DISCUSSÃO	129
5.5. CONCLUSÕES	136
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

INTRODUÇÃO

O gênero *Dioscorea* é considerado de grande importância econômica por apresentar muitas espécies potenciais produtoras de compostos esteroidais de interesse na medicina popular e pelas indústrias farmacêuticas, podendo ser utilizados como antiinflamatórios, agentes anticancerígenos, no tratamento de distúrbios por deficiência hormonal, na forma de contraceptivos orais e anabolizantes. Diosgenina, sapogenina esteroide utilizada como precursora de esteróides farmacologicamente ativos, tais como hormônios esteroidais e corticosteróides, é o principal composto encontrado em tubérculos de *Dioscorea composita*.

D. composita, espécie nativa do México, teve sua exploração acentuada na década de 80 e, como consequência, as populações naturais da espécie foram reduzidas. Por isso, o emprego da técnica de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais agrega valores a esta cultura, contribui para a adoção de novas abordagens para viabilizar a produção consistente de plantas e de metabólitos secundários, pois as culturas comerciais tornaram-se inviáveis devido ao longo período necessário para a exploração comercial.

Os estudos sobre o cultivo *in vitro* de plantas, a partir de segmentos nodais, possibilitam a otimização dos sistemas para a obtenção, programada ou planejada, de um grande número de mudas, isentas de patógenos, em um curto período de tempo e em espaço físico reduzido. O uso da cultura de tecidos para produção de metabólitos secundários é bastante difundido entre várias espécies de importância medicinal. A importância da diosgenina tem estimulado vários estudos do desenvolvimento de técnicas rápidas de detecção e identificação em micro escala, tal como a cromatografia em camada delgada e estudos sobre o potencial de produção de sapogeninas esteroidais por sistemas de cultura de células de várias espécies de *Dioscorea*, em especial *D. composita* e *D. floribunda*, mas são raras as

informações sobre o potencial de produção destes compostos através da cultura de órgãos, tais como os microtubérculos.

Em plantas de *D. composita*, cultivadas em condições naturais, os tubérculos são os órgãos em que são acumuladas as maiores quantidades de diosgenina e, portanto, a otimização de sistemas de produção de microtubérculos *in vitro* seria uma abordagem muito útil para avaliar o potencial de produção de sapogeninas, já que estariam facilitadas as possibilidades de manipulação dos sistemas de cultura. Por outro lado, os microtubérculos também poderiam ser utilizados para a propagação vegetativa e armazenamento de germoplasma.

Neste contexto foi conduzido o presente trabalho que consta de cinco capítulos, que abordam a importância do gênero *Dioscorea* e da espécie *D. composita* e estudos que permitem avaliar o potencial da utilização de abordagens biotecnológicas para a produção de plantas e de diosgenina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar o crescimento em diferentes condições de cultura *in vitro*, a aclimatização e os níveis de diosgenina, açúcares solúveis totais e amido dos tubérculos, microtubérculos e parte aérea das plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* Hemsl.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a capacidade de morfogênese, crescimento *in vitro* e de aclimatização dos somaclones produzidos *in vitro*, na ausência de reguladores de crescimento e determinar a densidade estomática e as dimensões dos estômatos dos somaclones S2 e S4.

2. Avaliar os efeitos de auxinas, citocininas e giberelinas, utilizadas isoladamente, sobre o crescimento *in vitro* das plantas dos diferentes somaclones.

3. Avaliar os efeitos de ácido giberélico, ácido naftalenoacético e glutamina sobre o crescimento *in vitro* das plantas dos diferentes somaclones.

4. Avaliar os efeitos do ácido giberélico, ácido naftalenoacético e ácido indolbutírico sobre a produção de diosgenina, açúcares solúveis totais e amido de plantas produzidas *in vitro* não aclimatizadas, do somaclone S5.

5. Determinar os níveis de diosgenina, açúcares solúveis totais e amido de tubérculos e parte aérea das plantas de diferentes somaclones produzidas *in vitro*, na ausência de reguladores de crescimento, e aclimatizadas.

CAPÍTULO 1

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Características da Família Dioscoreaceae

A família Dioscoreaceae (R.Br.) Lindley é uma das 17 famílias incluídas na ordem Liliiflorae, compreendendo 11 gêneros (Joly, 1998) e cerca de 900 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, com exceção da Antártica. Entretanto, somente algumas ocorrem nas partes quentes das zonas temperadas (Pedralli, 2004).

São monocotiledôneas, perenes, possuindo caules delgados a robustos, formando muitas vezes um emaranhado sobre outras plantas, ocorrendo também espécies eretas e herbáceas (Pedralli, 2002b). Estes caules apresentam ramificações podendo atingir vários metros, alguns com espinhos peciolares ou bulbilhos nas axilas das folhas (Barroso *et al.*, 1974).

As folhas apresentam grande variação morfológica (Pedralli, 2002b), sendo geralmente alternas, opostas ou espiraladas, lobadas ou não, pecioladas em forma de coração ou seta (Joly, 1998). A inflorescência desenvolve-se na axila das folhas superiores, em geral como panícula ou espiga (Joly, 1998). As flores são actinomorfas, trímeras, pequenas, geralmente unissexuais e algumas com odor. As flores masculinas possuem odor adocicado e grão de pólen viscoso fortemente aderido à antera; as femininas são maiores, com ovário

ínfero, tricarpetar, trilocular, em geral com muitos óvulos e alguns nectários septais (Weberling & Schwantes, 1986; Dahlgren & Clifford, 1982; Joly, 1998; Pedralli, 2002b).

Os frutos são do tipo cápsulas trialadas, bagas ou drupas (Pedralli, 2002b). As sementes podem ser aladas, ou não (Joly, 1998), reticuladas ou lisas, com tamanhos variados (Pedralli, 2002b), possuindo embrião pequeno bem diferenciado e cotilédone lateral imerso no endosperma, o qual contém lipídeos e aleurona (Pedralli, 2004).

Os órgãos de reserva são classificados como tubérculos e algumas espécies de *Dioscorea* apresentam a notável peculiaridade de gerar pesados tubérculos aéreos nas axilas foliares (Rizzini & Mors, 1995), denominados bulbilhos aéreos, acumulando água e nutrientes após a floração (Dahlgren & Clifford, 1982).

O gênero *Dioscorea* possui o maior número de representantes da família Dioscoreaceae, principalmente nos trópicos americanos (Joly, 1998). Estima-se que ocorram no Brasil entre 150 e 200 espécies de *Dioscorea*, único gênero da família presente em todas as regiões do país, desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul (Pedralli, 2002a e 2004). Os principais Estados produtores encontram-se na região Nordeste, onde são cultivados mais de 90% da produção brasileira, predominando o cultivo de espécies comestíveis. Espécies com finalidade farmacológica são cultivadas nas regiões Sul, Centro Sul, Sudeste, Oeste e Norte (Moura, 1995 *apud* Coelho, 2002).

Os tubérculos do gênero *Dioscorea* possuem um elevado potencial econômico (Rizzini & Mors, 1995), com cerca de 25 espécies utilizadas na alimentação humana. Estes tubérculos apresentam vitaminas do complexo B, contendo ainda vitamina A e C (ácido ascórbico), elevados teores de potássio, sódio, magnésio, fósforo, cálcio, ferro, cobre e zinco (Cazé Filho, 2002). São ricos em amido (Pedralli, 2004; Ammirato, 1984) sendo apreciados pela farinha (Rizzini & Mors, 1995). Contêm, aproximadamente, 8 a 10 mg de ácido ascórbico, em cada

100 g de tubérculo, e foram utilizados na prevenção do escorbuto por marinheiros em viagens através dos oceanos, o que facilitou a sua ampla distribuição pelos trópicos (Ammirato, 1984).

Dioscorea composita Hemsl., conhecida também como barbasco ou inhame mexicano, é uma planta trepadeira, nativa do México, que possui tubérculos grandes, chegando a pesar 50 kg. Apresenta folhas alternas, pecioladas e coriáceas, com largura entre 7 e 20 cm. É uma espécie dióica, com flores verdes e floração no período de junho a outubro (CONABIO - www.conabio.gob.mx). Apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada desde o nível do mar, formando vegetação secundária, até em florestas com altitude de 1500 metros (CONABIO - www.conabio.gob.mx).

1.1.2. Importância medicinal e atividades biológicas do gênero *Dioscorea*

D. composita foi a primeira espécie selvagem encontrada no México a ser explorada industrialmente, a partir de 1940, juntamente com *D. floribunda* (Viana, 1985; Oashi, 1999). Esta exploração pode ser explicada pelo fato de essas espécies possuírem diosgenina (Chu & Figueiredo-Ribeiro, 1991), metabólito secundário da classe das sapogeninas de maior importância econômica, devido ao fato de sua fórmula ($C_{27}H_{42}O_3$) ser muito semelhante à fórmula do progesterona natural ($C_{21}H_{30}O_2$) (Oashi, 1999). Esta última autora afirma que a procura por fontes alternativas de matéria-prima para a síntese de hormônios esteroidais (andrógenos, estrógenos e progesteronas) e corticosteróides, os quais podem ser utilizados como antiinflamatórios, agentes anticancerígenos, no tratamento de desordens por deficiência hormonal, na forma de contraceptivos orais e anabolizantes, resultou no fim da década de 40, na utilização de sapogeninas esteroidais vegetais em substituição às substâncias de origem animal, tais como o colesterol e os ácidos biliares. Sendo assim, a extração de diosgenina,

realizada a partir das espécies de *Dioscorea*, fez com que muitas dessas espécies se tornassem raras, dificultando e tornando caro para as indústrias utilizar fontes selvagens ainda não exploradas. Desta forma, as sapogeninas esteroidais adquiriram grande importância econômica, como precursores de esteróides farmacologicamente ativos, incluindo os anticoncepcionais de via oral, os corticosteróides e os hormônios sexuais (Brenac & Sauvaire, 1996; Oashi, 1999).

Entretanto, o intenso extrativismo na década de 80, não tendo sido acompanhado da otimização dos métodos de cultivo agrônômico das espécies, e a coleta indiscriminada de plantas silvestres, provocaram a escassez dessa matéria prima. Assim, as populações naturais de *Dioscorea*, produtoras de diosgenina, foram reduzidas em seu habitat natural (Viana, 1985; Rizzini & Mors, 1995; Oashi, 1999). O potencial comercial da diosgenina, cujo preço está em torno de 674 dólares o quilograma, pode ser uma das razões do extrativismo predatório (Scragg, 1994).

De acordo com Viana (1985), o cultivo, em larga escala, das espécies de *Dioscorea* utilizadas para a produção de sapogeninas, não foi bem sucedido, pois a necessidade de tutoramento das plantas e a produção de tubérculos de grande tamanho encareciam o plantio e a coleta.

Devido às dificuldades geradas pela restrição da matéria-prima obtida a partir de tubérculos de *Dioscorea*, os laboratórios iniciaram a utilização e a produção de parte dos hormônios a partir da hecogenina, presente no suco do sisal. Outras fontes também utilizadas são o estigmasterol e o sitosterol, obtidos dos resíduos da purificação do óleo de soja, tendo a vantagem de serem mais abundantes (Rizzini & Mors, 1995).

Utilizados principalmente por atletas fisiculturistas, os produtos anabolizantes também são provenientes de sapogenina esteroidal. Estes hormônios esteroidais contêm alguns miligramas de sapogeninas, tais como o estigmasterol e o sitosterol, além de muitos

possuírem extrato de raízes de *Dioscorea*, especialmente *D. composita*, em sua formulação. A indústria voltada para a produção desses anabolizantes varia seus preços no mercado de acordo com a quantidade de sapogeninas em cada formulação, tendo lucros de dezenas a centenas de reais (SUPLEMENTOS ON LINE - www.suplementoonline.com.br).

Outras propriedades em estudo envolvem a atividade antimutagênica (Miyzawa *et al.*, 1996); a atividade antifúngica e moluscicida (Yamamoto *et al.*, 1996); o combate à diabetes através da utilização da *Dioscorea japonica* (Verspohl, 2002); a atividade antioxidante de *D. batatas*, sendo importante no tratamento de processos degenerativos ou patológicos, tais como o envelhecimento, doenças coronárias e o mal de Alzheimer (Hou *et al.*, 2002). Além disso, *D. villosa* L. é espécie utilizada nos tratamentos de dores do parto, cólicas, irritações gastrointestinais, náusea e vômito matutino, asma, soluço e reumatismo (Edwards *et al.*, 2002).

As plantas do gênero *Dioscorea* também são amplamente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer. *D. collettii* var. *hypoglauca* é uma espécie utilizada, por vários séculos, como remédio na China, pois possui em seu rizoma 14 tipos de saponinas esteroidais (Hu *et al.*, 1997), sendo utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, tais como câncer cervical, tumor renal e da bexiga (Hu & Yao, 2002). Além disso, esta espécie apresenta citotoxicidade contra leucemia aguda humana, quando testada em linhagens de células *in vitro*, além de mostrar atividade citotóxica também contra câncer de colo, devido à presença de protodioscina, uma saponina furostanol purificada do rizoma desta variedade (Hu & Yao, 2002). *D. birmanica* Prain & Burkill e *D. membranacea* Pieere ex. Prain & Burkill, tradicionalmente utilizadas como plantas medicinais para o tratamento de câncer na Tailândia, também mostraram atividade citotóxica efetiva quando testadas *in vitro*, em linhagens de células de carcinoma do pulmão, adenocarcinoma do cólon e adenocarcinoma de mama (Itharat *et al.*, 2004).

Algumas espécies de *Dioscorea*, consideradas tóxicas, são utilizadas pelos indígenas Xavantes, Borore, Pacaas, Novos, Surui, Cinta Larga e Kajara, das regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, em suas flechas na pesca e na caça (Pedralli, 2002b).

Muitas atividades biológicas relatadas para o gênero *Dioscorea* favoreceram o extrativismo dessas espécies e reforçam a necessidade de estudos de conservação e produção dos metabólitos secundários de interesse farmacológico. Porém, o manejo inadequado da cultura de *Dioscorea*, a utilização de tubérculos de tamanhos heterogêneos, a contaminação por microorganismos, a qualidade agrônômica inferior, o elevado custo dos tubérculos para iniciar o plantio e a indisponibilidade de material vegetal, são algumas das limitações impostas à produtividade de várias espécies de *Dioscorea* (Cazé Filho, 2002). Por isso, o emprego de técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos agrega valores a esta cultura, por contribuir para a adoção de novas abordagens, as quais viabilizam a produção de plantas, de metabólitos secundários e conservação de germoplasma de várias espécies de *Dioscorea*.

1.1.3. Importância da aplicação de técnicas de culturas de células, tecidos e órgãos na multiplicação *in vitro*

Estudos sobre cultura de tecidos vegetais têm auxiliado no melhor entendimento da fisiologia do crescimento de regiões isoladas da planta, sem a interferência dos efeitos das demais partes do vegetal, eliminando-se, também, a influência do meio ambiente. A grande capacidade de regeneração dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* se deve, fundamentalmente, à totipotencialidade das células vegetais (Kerbaudy, 1999), que permite manifestar, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular.

A multiplicação *in vitro* apresenta várias vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, pois permite a obtenção de um grande número de mudas em um curto período de tempo e em espaço físico reduzido (Lauzer *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 1998), além de possibilitar a produção de plantas isentas de patógenos. As técnicas de cultura de tecidos vegetais e a produção de microtubérculos *in vitro*, também são alternativas interessantes, em relação aos métodos convencionais, adotadas para diferentes espécies de *Dioscorea*, uma vez que ajudam a resolver três importantes problemas: a propagação vegetativa, a produção de diosgenina e de outras sapogeninas e a conservação de germoplasma (Furmanowa & Guzewska, 1989; Jean & Cappadocia, 1991).

A partir da década de 70, as técnicas de cultura de tecidos vegetais ganharam grande impulso, em âmbito comercial, logo após a primeira aplicação realizada por Morel, em 1960, de multiplicação de orquídeas mediante cultura de ápices caulinares. No ano de 1974, Murashige apresentou o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Esses estágios permitem alterações, conforme as peculiaridades de cada espécie, sendo eles: seleção e desinfestação dos explantes (estágio I); multiplicação dos explantes (estágio II) e aclimatização (estágio III) (Grattapaglia & Machado, 1998).

A multiplicação dos explantes pode ser feita através de cultivo de gemas axilares (segmento nodais), organogênese direta ou indireta e via embriogênese somática. A cultura de partes aéreas, tal como o cultivo *in vitro* de segmentos nodais, é uma das técnicas utilizadas na cultura de tecidos vegetais, que envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados e a estimulação de seu crescimento. As plantas regeneradas através desta técnica apresentam uma fidelidade genética muito alta. Além disso, os segmentos nodais, que contém gemas axilares, apresentam determinação para o crescimento vegetativo, desenvolvendo-se naturalmente quando supridas suas necessidades nutricionais (Grattapaglia & Machado, 1998).

A fase de aclimatização pode ser considerada a mais delicada do processo de micropropagação. A baixa luminosidade e a elevada umidade relativa encontrada nas condições *in vitro*, associadas à conseqüente redução da taxa de transpiração, faz da transferência de plantas produzidas *in vitro* para um novo ambiente, um estágio crítico. Por isso, a aclimatização, definida por Costa (1998) como processo realizado artificialmente, onde ocorre a adaptação climática da planta, quando transferida para um novo ambiente, representa uma fase muito sensível da micropropagação. Esta fase representa um estresse para a planta, devido às mudanças pertinentes às condições ambientais, quando da transferência das plantas da situação *in vitro* para a situação *in vivo* (Read & Fellman, 1985; Azcón-Aguilar *et al.*, 1997).

Quando *in vitro*, as plantas nos estágios de diferenciação, multiplicação e enraizamento, apresentam comportamento heterotrófico, visto que possuem a sua disposição alta concentração de nutrientes, devido ao aporte artificial do meio de cultura, significativa quantidade de açúcar utilizada como fonte de carbono, baixa intensidade luminosa, alta umidade relativa do ar e trocas gasosas limitadas (Costa, 1998; Estrada-Luna *et al.*, 2001). Quando transferidas para condições *in vivo*, há necessidade de iniciar a absorção de sais e os processos fisiológicos necessários para seu desenvolvimento e sobrevivência, dando início ao comportamento autotrófico da planta (Yano-Melo *et al.*, 1999), ocorrendo, então, um grande gasto de energia. Por isso, a qualidade das plantas regeneradas *in vitro*, no momento de sua transferência para a aclimatização, é um dos fatores fundamentais para o sucesso desta etapa da micropropagação (Van Huylenbroeck & Debergh, 2000), onde as características fisiológicas, bem como as anatômicas, desempenham um importante papel neste contexto.

Outros pontos considerados críticos para o desenvolvimento vegetal durante a fase de aclimatização devem ser controlados, tais como a transferência gradual das plantas para uma intensidade de luz maior do que a requerida na condição *in vitro*, evitando, assim, a destruição

das moléculas de clorofila e, conseqüentemente, a clorose. Além disso, a manutenção de alta umidade relativa do ar, favorecendo o estabelecimento das plantas sob as condições de aclimatização, tende a diminuir o estresse causado pelo possível déficit hídrico (Costa, 1998).

Entretanto, mudanças fisiológicas e genéticas podem se manifestar em plantas produzidas através da cultura de calos ou da cultura de tecidos vegetais (Bouman & De Klerk, 2001), ocorrendo assim a variação somaclonal, termo definido por Larkin & Scowcroft (1981) como mudanças genéticas ocasionadas pelas condições da cultura *in vitro*. Esta variação pode ser genética ou epigenética, ambas contribuindo para variações fenotípicas e genotípicas observadas nas plantas (Jain, 2001).

Apesar da ampla utilização e da importância dada à cultura de tecidos para muitas espécies vegetais, há uma carência de informações detalhadas sobre os processos de regeneração de *Dioscorea* (Twyford & Mantell, 1996). Viana & Mantell (1989) relataram a indução de calos a partir da cultura de embriões zigóticos em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 18 μM de 2,4-D e a regeneração de plantas a partir de calos em meio de cultura contendo 0,1 μM de zeatina e 3,3 mM de glutamina. Porém, pouco se sabe sobre o comportamento e o potencial de crescimento *in vitro* de somaclones de *Dioscorea composita* Hemsl. regenerados a partir de calos, sendo importante a avaliação desse crescimento através da capacidade de morfogênese e multiplicação.

1.1.4. Importância da aplicação de técnicas de culturas de células, tecidos e órgãos na produção de diosgenina

A cultura de tecidos vegetais pode ser uma ferramenta para a produção de metabólitos secundários, tais como a diosgenina em plantas de *Dioscorea composita*. A cultura de

suspensões celulares é considerada o sistema mais adequado para viabilizar a produção, em larga escala, de metabólitos secundários de interesse (Stafford, 1991). Porém, de acordo com este autor, culturas diferenciadas, como cultura de ramos, de raízes e de embriões somáticos, têm sido desenvolvidas para diferentes espécies, podendo resultar em maior produção, em termos de percentagem da matéria seca. Charlwood *et al.* (1990), explicam que o menor acúmulo de metabólitos secundários por culturas de calos e suspensões celulares, quando comparado com cultura de órgãos vegetais, pode ser resultante da falta de expressão de genes que controlam os passos essenciais das vias biossintéticas do metabolismo secundário nas células não especializadas dos calos. É possível, também, que a ausência, dentro da célula, de compartimentos para o armazenamento dos metabólitos secundários ou, ainda, a ausência de mecanismos de transporte para a remoção dos produtos finais tóxicos, propiciem o menor acúmulo de metabólitos secundários. Outro aspecto da produção de metabólitos secundários por suspensões celulares, que muitas vezes torna o processo inviável, por gerar altos custos, é a necessidade de se utilizar dois diferentes meios de cultura, em alguns casos: o primeiro para o crescimento e estabilização das células e o segundo para a indução da produção do metabólito (Phillipson, 1990).

Stafford (1991), relata casos em que suspensões de células produziram os metabólitos secundários de interesse, em quantidade maior do que as encontradas nas próprias plantas. Para *D. deltoidea*, a produção de diosgenina, via suspensões celulares, atingiu o valor de 2% da massa seca, semelhante ao produzido pelas plantas. Entretanto, Datta & Datta (1984), quantificando o teor de diosgenina em culturas de calos de *D. composita*, obtiveram variação de 0,89% de diosgenina, em termos da massa seca, em calos com 30 dias de cultivo, a 1,61%, em calos com 90 dias de cultivo. Esses valores foram inferiores aos teores de diosgenina produzidos pelos tubérculos das plantas cultivadas em condições naturais, que apresentaram 3,6% de diosgenina em relação à massa seca.

De acordo com Heble & Staba (1980), a síntese de diosgenina em sistemas que envolvem culturas de tecidos é dependente do desenvolvimento morfogênético e está relacionada aos diferentes níveis da citocinina benzilaminopurina (BAP) no meio de cultura. Estes autores observaram baixo teor de diosgenina em plantas de *D. composita* com poucas folhas e caules alongados, que cresciam em meios contendo 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, e alto nível de diosgenina, em plantas que apresentavam muitas folhas e múltiplas gemas meristemáticas, como no meio contendo 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. O acúmulo de diosgenina em plantas de *D. composita* ocorre nos tubérculos, e o nível de BAP pode afetar significativamente a morfogênese de *D. composita* e os processos envolvidos na biossíntese da diosgenina.

A produção do metabólito secundário em plantas do gênero *Dioscorea* pode ser aperfeiçoada pela manipulação dos constituintes do meio de cultura, tais como as fontes de carbono e de nitrogênio (Tal *et al.*, 1982). Tais autores verificaram, ainda, que as condições para o máximo crescimento celular nem sempre são as condições necessárias para a máxima produção de diosgenina, não havendo relação direta entre o crescimento celular e a produção do metabólito secundário.

A produção de diosgenina também foi estudada em *D. floribunda* por Aminuddin & Chowdhury (1983), que utilizaram calos derivados da cultura do meristema apical e de tecidos dos tubérculos. Esses autores observaram que as células provenientes da cultura de tecidos dos tubérculos apresentaram maior conteúdo de diosgenina (1,10% em relação à massa seca, na oitava semana de cultura) quando comparados com o conteúdo apresentado pelas células oriundas da cultura do meristema apical (0,194% da massa seca, na oitava semana de cultura).

O entendimento da sequência da biossíntese de diosgenina e o tempo de aparecimento deste metabólito são importantes para a otimização de sua quantificação e extração. Tal *et al.* (1984), pesquisaram inibidores metabólicos para melhor compreender a sequência da

biossíntese de diosgenina em suspensões celulares de *D. deltoidea*. De acordo com esses autores, alguns desses inibidores metabólicos interferiram na formação de metabólitos derivados do ácido mevalônico. Esta interferência na via do ácido mevalônico pode influenciar na produção de diosgenina, pois apesar de a síntese de diosgenina em cultura de células vegetais ter sido relatada a partir do metabolismo do colesterol, Sttaford & Warren (1991), afirmam que a síntese de diosgenina resulta, também, da via do ácido mevalônico.

Drapeau *et al.* (1986) otimizaram os métodos para extração de diosgenina produzida por cultura de células de *D. deltoidea* utilizando o método de hidrólise com ácido sulfúrico e isopropanol e não o método tradicional com ácido clorídrico. Eles demonstraram que a diosgenina pode ser obtida diretamente durante a fase de crescimento das células e não apenas quando as culturas entram na fase estacionária, como propõem Tal *et al.* (1984), ao indicarem que o acúmulo dos metabólitos intermediários da biossíntese de diosgenina ocorre nas fases iniciais do crescimento e que os mesmos são transformados em diosgenina pelas células quando as culturas entram na fase estacionária.

Como espécies produtoras de diosgenina têm a produção deste metabólito iniciada nas folhas para, posteriormente, ser acumulado nos tubérculos, estudos relacionados à indução e ao desenvolvimento dos tubérculos e dos microtubérculos na cultura de tecidos vegetais são imprescindíveis. A indução e o desenvolvimento de tubérculos são fenômenos complexos e influenciados por variáveis como nutrição, ambiente, genética, área foliar e substâncias reguladoras de crescimento (Arteca, 1996). De acordo com este autor, uma série de eventos ocorre durante a indução e o crescimento do tubérculo. Após o início das divisões celulares, o primeiro sinal bioquímico da tuberização é a deposição de amido. Alguns autores consideram que a formação de tubérculos ocorre como resultado de um decréscimo no fotoperíodo, o que restringe a utilização de carboidratos para o alongamento do caule ou para o desenvolvimento de flores e frutos (Chu, 1998).

1.1.5. Importância da indução de microtubérculos do gênero *Dioscorea* em sistemas de cultura *in vitro*

A indução de microtubérculos *in vitro* foi observada em algumas espécies de *Dioscorea*. Os microtubérculos são considerados propágulos que facilitam o armazenamento, o intercâmbio de germoplasma e a transferência das plantas micropropagadas para o campo (Ammirato, 1984). Mantell & Hugo (1989), relatam que alguns componentes do meio de cultura são fundamentais para o processo de tuberização *in vitro* de certas espécies de *Dioscorea*, tais como a concentração de sacarose, reguladores de crescimento, especialmente citocininas, auxinas e ácido abscísico, e a manutenção das culturas sob fotoperíodo de dias curtos.

A sacarose é uma das principais formas em que o carbono é translocado e, conseqüentemente, o principal substrato para o metabolismo vegetal (Farrar *et al.*, 2000). Kouassi *et al.* (1990) demonstraram, através da cromatografia, que D-frutose, D-glucose e maltose estavam presentes nos tubérculos de *D. esculenta*. Porém, a sacarose encontrava-se em maior quantidade, perfazendo 2% a 8% da massa seca, podendo, ainda, este conteúdo ser aumentado durante período de estocagem dos tubérculos. Em *D. alata* o aumento dos açúcares chegou a 30%, em *D. rotundata* a 31,5% e em *D. esculenta* a 72,5%.

Geralmente, baixos níveis de carboidratos potencializam o incremento da expressão gênica da fotossíntese, da mobilização de reservas e dos processos de translocação, enquanto que o excesso favorece os processos de armazenamento (Chu, 1998). O conteúdo elevado de sacarose induz mudanças na expressão dos genes que desencadeiam a síntese de sacarose sintetase e da sacarose invertase (Farrar *et al.*, 2000), chegando a alterar o programa de desenvolvimento da planta (Chu, 1998). A quantidade ótima de sacarose para a indução e

desenvolvimento de microtubérculos, depende da espécie em questão, do meio de cultura e dos reguladores de crescimento (Lauzer *et al.*, 1992).

O balanço hormonal também está relacionado com a indução da tuberização e o desenvolvimento dos tubérculos. Há muitos estudos sobre o efeito das giberelinas exógenas e endógenas na tuberização, e em ambos os casos, as giberelinas têm efeito inibitório na promoção da tuberização. Níveis endógenos de citocininas promovem a tuberização, e o fornecimento exógeno das mesmas também tem mostrado efeito indutor, sendo esta resposta promovida pela interação entre auxinas e citocininas (Arteca, 1996). O ácido jasmônico e seu metil éster estão relacionados com o processo de tuberização, sendo importantes na formação de microtubérculos em plantas de *D. alata*, *D. rotundata* e *D. cayenensis* cultivadas *in vitro*, mas apenas quando foram utilizadas baixas concentrações de sais em combinação com fotoperíodo de dias curtos (Jasik & Mantell, 2000). John *et al.* (1993) observaram que o ácido abscísico (ABA) e o ácido naftalenoacético (ANA) estimularam o crescimento de microtubérculos induzidos em plantas micropropagadas de *D. alata*, enquanto que as citocininas inibiram o crescimento dos mesmos.

Estudos preliminares conduzidos por Alizadeh *et al.* (1998), sobre a indução de microtubérculos em plantas micropropagadas de *D. composita*, indicaram que o ANA, o ácido indolacético (AIA), o ácido indolbutírico (AIB), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a 2-isopenteniladenina (2iP), a adeninahemisulfato e o ABA, quando utilizados isoladamente, induziram a formação de microtubérculos em 70-100% das plantas, enquanto que as taxas de indução obtidas para a benziladenina e cinetina foram menores que 66%. Entretanto, apenas nos meios de cultura contendo ANA, AIA, AIB e 2,4-D foram produzidos microtubérculos com maiores massas frescas, superiores a 240 mg por microtúbculo. Estes autores também relatam que concentrações de sacarose acima de 8% promoveram aumento significativo da massa fresca dos microtubérculos, 700-800 mg por microtúbculo, após 8 meses de cultura e

que, na presença de cinetina, as formulações salinas dos meios Murashige e Skoog, Anderson Rhododendron e B5 promoveram a indução de microtubérculos, mas apenas nos dois primeiros meios os pesos de matéria fresca dos mesmos foram superiores a 100 mg por microtubérculo.

A ausência de dados na literatura sobre o crescimento, desenvolvimento e processos de tuberização de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* Hemsl., produzidos *in vitro*, a partir da regeneração de um único calo, bem como a ausência de estudos sobre a composição bioquímica dos microtubérculos produzidos *in vitro*, especialmente quanto ao potencial dos mesmos para a produção de diosgenina estimulou a realização do presente trabalho no Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, na Universidade Federal de Santa Catarina em parceria com a Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

CAPÍTULO 2

MORFOGÊNESE, CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE SOMACLONES DE *D. composita* NA AUSÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO

2.1. INTRODUÇÃO

Um sistema de regeneração de plantas de *D. composita* a partir de calos, originados através da cultura de embriões zigóticos, foi descrito por Viana & Mantell (1989). Porém, não foram conduzidos experimentos posteriores para avaliar o potencial de micropropagação e aclimatização destas plantas.

De um modo geral há uma carência de informações detalhadas sobre os processos de regeneração de plantas do gênero *Dioscorea* a partir de calos, especialmente sobre as espécies de importância medicinal (Twyford & Mantell, 1996). Tais estudos são importantes, pois permitem otimizar métodos para a produção *in vitro* de plantas em larga escala. A otimização de protocolos de micropropagação requer, para muitas espécies, a utilização de reguladores de crescimento na fase de multiplicação de ramos, a partir de segmentos caulinares contendo as gemas axilares ou apicais, e de enraizamento dos mesmos (Grattapaglia & Machado, 1998). Contudo, a utilização de reguladores de crescimento em sistemas de cultura *in vitro*, principalmente quando o objetivo é a manutenção da fidelidade genética das plantas

micropropagadas, deve ser monitorada cuidadosamente, uma vez que estes podem contribuir para a indução de variabilidade genética (Jain, 2001). Um outro aspecto importante refere-se à otimização de protocolos de aclimatização, que podem requerer procedimentos sofisticados para amenizar o estresse gerado durante a adaptação das plantas micropropagadas às condições *ex vitro* (Van Huylenbroeck & Debergh, 2000).

Os objetivos deste estudo foram avaliar o crescimento *in vitro* e a capacidade de aclimatização das plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*, micropropagadas na ausência de reguladores de crescimento.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Origem do material vegetal e manutenção dos estoques dos diferentes somaclones de *D. composita*

A partir da regeneração de um único calo produzido a partir da cultura de embrião zigótico, segundo a metodologia descrita por Viana & Mantell (1989) originaram-se sete plantas de *Dioscorea composita*, permanecendo viáveis apenas cinco, denominadas somaclones S1, S2, S3, S4, e S5. Essas plantas foram isoladas do calo e multiplicadas, em períodos de 60 dias, através da cultura de segmentos nodais caulinares contendo gema axilar foliar (Figura 1A) em meio de cultura MS (Sigma, Co.) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose 2% (p/v) e Phytigel® (Sigma, Co.) a 0,2% (p/v). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 M ou HCl 1 N, antes da autoclavagem, sendo

distribuídos 8 mL de meio em cada tubo de ensaio (25 x 150 mm), fechados com tampas de polipropileno, autoclavados durante 18 minutos a $1,1 \text{ Kg.f.cm}^{-2}$, em temperatura de 121°C . Após a inoculação, cada tubo foi fechado com um filme de polipropileno (72 mm x 72 mm) preso com elástico de borracha e com uma tira de filme de PVC.

As culturas dos diferentes somaclones foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), sob fotoperíodo de 16 horas, mantido por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, com fluxo de fótons de $22,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 70%. Estas condições de cultura foram utilizadas em todos os experimentos descritos a seguir, exceto quando outras condições foram requeridas. Estas plantas (Figura 1B) forneceram os segmentos nodais caulinares contendo gema axilar foliar para a montagem de todos os experimentos subsequentes.

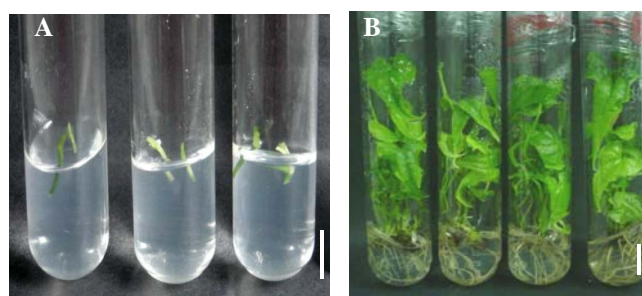


Figura 1. Segmentos nodais caulinares de *Dioscorea composita* (A) e plantas com 60 dias de idade (B), produzidas em meio Murashige & Skoog suplementado com sacarose 2% e phytigel 0,2% a partir da morfogênese dos segmentos nodais caulinares (barra= 1cm).

2.2.2. Crescimento *in vitro* dos diferentes somaclones

Segmentos nodais caulinares contendo gema axilar foliar, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, foram removidos de plantas de 60 dias de idade dos diferentes somaclones, cultivadas nas condições descritas no item 2.2.1 e inoculados em número de dois por tubo de

ensaio contendo o meio de cultura MS suplementado com 2% de sacarose e 0,2% de Phytigel. A avaliação dos diferentes somaclones foi realizada semanalmente, quanto à percentagem de formação de ramos e de raízes, e após 56 dias, quanto ao número de nós e de folhas produzidas por planta. No primeiro caso foram utilizadas três repetições de 10 tubos de ensaio, para cada somaclone, contendo cada tubo 3 explantes. No segundo, foram utilizadas 30 repetições por somaclone.

2.2.3. Aclimatização de plantas dos diferentes somaclones

2.2.3.1. Aclimatização de plantas em bandejas plásticas em câmara de crescimento

Plantas de 60 dias de idade dos somaclones S1, S2, S3 e S4, produzidas de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1., foram transferidas para bandejas plásticas (24 cm x 17 cm x 10 cm) (Figura 2A) contendo substrato composto de areia e terra na proporção de 1:1. As bandejas foram mantidas fechadas durante 30 dias, em sala de crescimento, nas condições descritas no item 2.2.1. Foram utilizadas duas repetições de 10 plantas cada, para cada somaclone. Após 30 dias, as plantas sobreviventes de cada somaclone, foram transferidas para areia e terra na proporção de 1:1, por volume, em copos plásticos de 300 mL. Essas plantas foram mantidas dentro de bandejas plásticas fechadas de 28 L (Figura 2B), nas mesmas condições de crescimento, durante 60 dias. A abertura das tampas das bandejas foi realizada gradualmente durante a aclimatização, até a exposição completa das plantas. Semanalmente, avaliou-se a percentagem de sobrevivência dos somaclones ao longo do experimento.

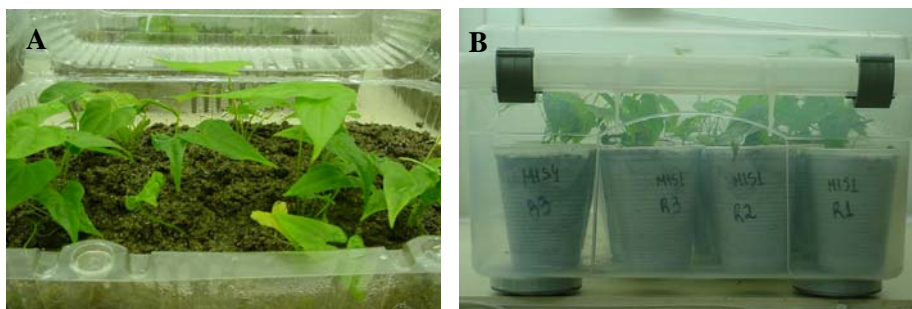


Figura 2. Plantas de *Dioscorea composita* com 30 dias de idade, aclimatizadas em bandejas plásticas de 24 cm x 17 cm x 10 cm (A) e transferidas para copos plásticos nas bandejas de 28 L (B).

2.2.3.2. Aclimatização de plantas em copos plásticos em câmara de crescimento

Plantas de 60 dias de idade dos somaclones S1, S2, S3 e S4, produzidas de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1., foram transferidas para substrato composto de areia e terra, na proporção de 1:1, em copos plásticos de 300 mL. Essas plantas foram colocadas dentro de bandejas plásticas fechadas de 28 L. As bandejas foram mantidas durante 60 dias, em sala de crescimento, nas condições descritas no item 2.2.1. As tampas foram removidas gradualmente, até a completa exposição das plantas ao ambiente. A percentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada semanalmente, durante 60 dias. Foram utilizadas 3 repetições de no mínimo 10 plantas por somaclone.

2.2.3.3. Aclimatização em vasos de 2,5 L em casa de vegetação

Após permanecerem 120 dias nas condições descritas no item 2.2.3.2., as plantas sobreviventes dos somaclones S1, S2, S3 e S4 foram transferidas para vasos de 2,5 L, contendo substrato composto de areia e terra, na proporção de 1:1. Permaneceram em

ambiente sombreado por 4 semanas e, em seguida, foram transferidas para casa de vegetação, com temperatura variando entre 35°C para a mínima e 38°C para a máxima. As plantas foram cobertas com sombrite reduzindo a intensidade luminosa em 50% por 4 meses, sendo regadas, com água potável, uma vez por semana. Após o período em casa de vegetação, o crescimento das plantas foi avaliado através da determinação das massas frescas e secas da parte aérea e dos tubérculos. A partir desses dados foram calculados os teores de água dos tubérculos, assim como os valores da razão massa seca/massa fresca da parte aérea e dos tubérculos e da razão massa seca do tubérculo/massa seca da parte aérea. A percentagem de sobrevivência também observada. Foram utilizadas no mínimo 5 repetições de cada somaclone.

2.2.4. Determinação da massa seca das plantas

Após a determinação da massa fresca, a parte aérea e os tubérculos das plantas foram colocados em embalagens de papel e mantidos em estufa por pelo menos 48 horas a 85°C. O teor de água dos tubérculos foi expresso em percentagem da massa fresca e determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{Teor de água (\% da massa fresca)} = (\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / \text{massa fresca} * 100.$$

2.2.5. Determinação da densidade estomática e das dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos dos somaclones S2 e S4

Folhas frescas, totalmente expandidas, de plantas dos somaclones S2 e S4, cultivados em meio básico MS, durante 150 dias, foram utilizadas para determinar a densidade

estomática bem como as dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos. Todas as observações foram realizadas em microscópio óptico, marca Zeiss-Jena, modelo Loboal 4, com magnitude de 400 x, no laboratório de Anatomia Vegetal da UFSC. Réplicas da superfície abaxial de zonas costais da região mediana das folhas foram retiradas, com auxílio de esmalte incolor, e montadas entre lâmina e lamínula. Para contagem do número de estômatos por área, em 32 repetições para cada somaclone, foram projetadas imagens sobre área delimitada conhecida, com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico. A densidade estomática é apresentada em número de estômatos.mm⁻².

A determinação das dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos foi feita utilizando imagens projetadas em papel com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico, onde o comprimento (eixo longitudinal entre os dois pólos da célula) e a largura (eixo transversal mediano da célula) foram determinados e aferidos com escala micrometrada. Para cada somaclone foram utilizadas 40 repetições.

2.2.6. Análise estatística

Os experimentos foram montados seguindo-se o delineamento estatístico completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA) e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (Gomez & Gomez, 1984). Os dados em percentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada antes de serem submetidos à ANOVA.

Os dados dos experimentos sobre a avaliação da densidade estomática e dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos foram submetidos ao teste t , ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Foi determinado o número mínimo amostral pela equação $n=(t^2.s^2).d^{-2}$, onde

“t” é dado pela tabela de Student (considerando n-1, para significância de 0,05), “s” é o desvio padrão e “d” é igual a $E/100 \times \text{média}$, onde $E=10$ para 10% de probabilidade, valor considerado satisfatório (Sokal & Rohlf, 1969).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Morfogênese *in vitro* de segmentos nodais caulinares de diferentes somaclones

As percentagens de segmentos nodais caulinares dos diferentes somaclones, que formaram ramos ao longo dos 56 dias de cultivo são mostradas na Figura 3. Observa-se que, para todos os somaclones, a brotação de ramos, a partir da gema axilar pré-existente no explante, foi detectada antes do sétimo dia de avaliação do experimento. A percentagem inferior de formação de ramos foi observada para o somaclone S2 já por volta de quatorze dias do início do experimento. A partir do 28º dia de cultivo as diferenças entre os somaclones mantiveram-se constantes, apresentando o somaclone S4 a maior percentagem neste período ($94,6 \pm 5,8\%$), contrastando com o somaclone S2, cuja percentagem de formação de ramos foi a mais baixa ($63,4 \pm 8,7\%$).

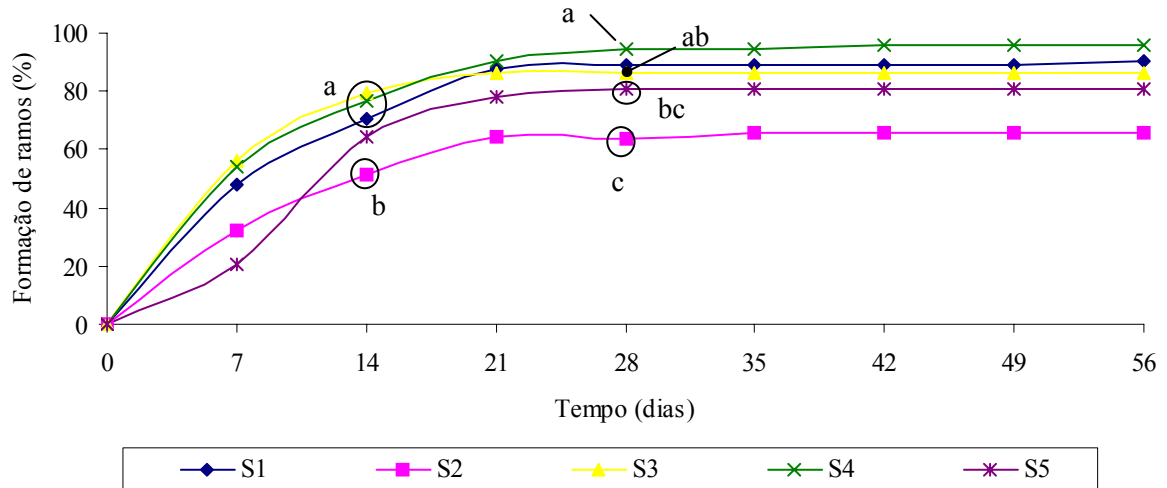


Figura 3. Formação de ramos em segmentos nodais caulinares de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2% de sacarose, na ausência de reguladores de crescimento.

Quando se compara, para cada somaclone, a percentagem de segmentos nodais caulinares que formaram ramos após 28 e 56 dias de cultivo, verifica-se que não foram detectadas diferenças entre os diferentes períodos de cultivo (Figura 4).

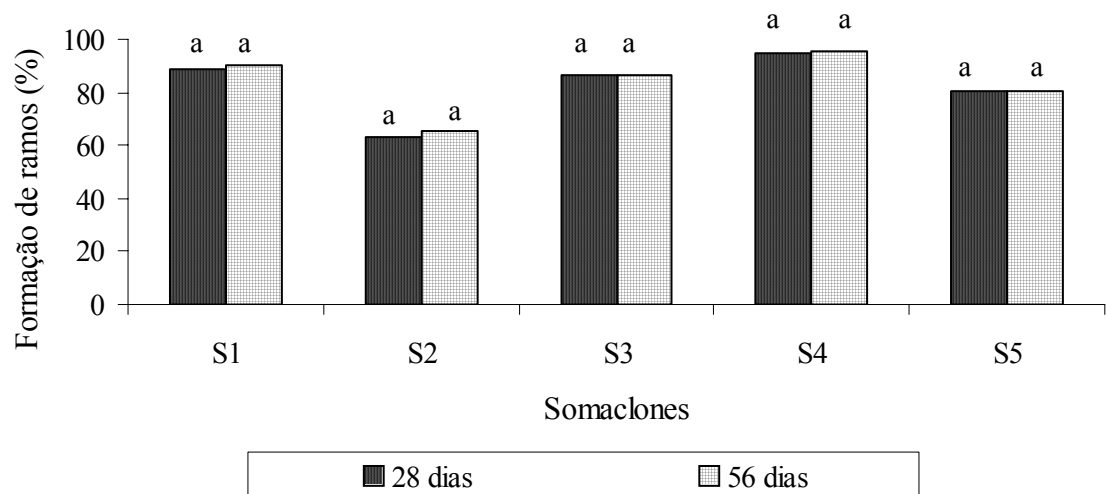


Figura 4: Formação de ramos dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* aos 28 e 56 dias de cultivo em meio básico Murashige & Skoog, na ausência de reguladores de crescimento.

A análise de crescimento das plantas dos diferentes somaclones cultivadas durante 56 dias em meio de cultura básico MS, indica diferenças entre os somaclones, em relação ao número de nós e à percentagem final de culturas que produziram ramos e raízes. Apenas para a variável do número de folhas não foram detectadas diferenças entre os somaclones (Tabela 1). A formação de ramos observada, após 56 dias do início do experimento indicou que houve grande variação entre as percentagens de brotação, tendo o somaclone S4 maior valor (95,98%). O somaclone que apresentou a menor percentagem de brotação das gemas axilares foi o S2 (66,67%), os somaclones S1 e S3, foram semelhantes.

Tabela 1. Morfogênese e crescimento *in vitro* de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* em meio de cultura Murashige & Skoog, após 56 dias de cultura. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Formação de ramos (%) ^a	Formação de raízes (%) ^a	Número de nós.planta ^{-1a}	Número de folhas.planta ^{-1a}
S1	90,43 ± 3,7 b	88,61 ± 6,0 ab	4,73 ± 1,8 ab	7,27 ± 2,6 a
S2	66,67 ± 11,7 d	45,28 ± 15,0 c	4,00 ± 2,4 ab	5,80 ± 2,6 a
S3	88,10 ± 4,1 b	81,30 ± 6,4 abc	2,93 ± 1,2 b	7,40 ± 4,9 a
S4	95,98 ± 3,7 a	90,46 ± 5,7 a	3,93 ± 1,8 ab	5,40 ± 1,8 a
S5	83,47 ± 2,3 c	78,24 ± 0,8 bc	5,80 ± 1,9 a	6,00 ± 2,0 a

^a Médias ± desvio padrão de trinta repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As raízes já foram detectadas nos explantes a partir de quatorze dias do início do experimento (Figura 5). Contudo, para todos os somaclones observou-se que a percentagem de enraizamento não estabilizou por volta de 28º dia de cultivo, continuando a aumentar até o 56º dia de cultivo. Após 56 dias do início do experimento, a menor percentagem de enraizamento dos explantes foi observada para o somaclone S2 (45,28%), sendo, entretanto, semelhante aos somaclones S3 (81,30%) e S5 (78,24%). O somaclone S5 foi o que apresentou maior número de nós por planta (5,8) para cada planta, mas este valor não diferiu dos obtidos para os somaclones S1, S2 e S4. O somaclone S3 apresentou o menor número de nós por

planta (2,93). Com relação ao número de folhas verifica-se, entretanto, que os somaclones não diferiram entre si, apresentado de 5,4 a 7,27 folhas por planta.

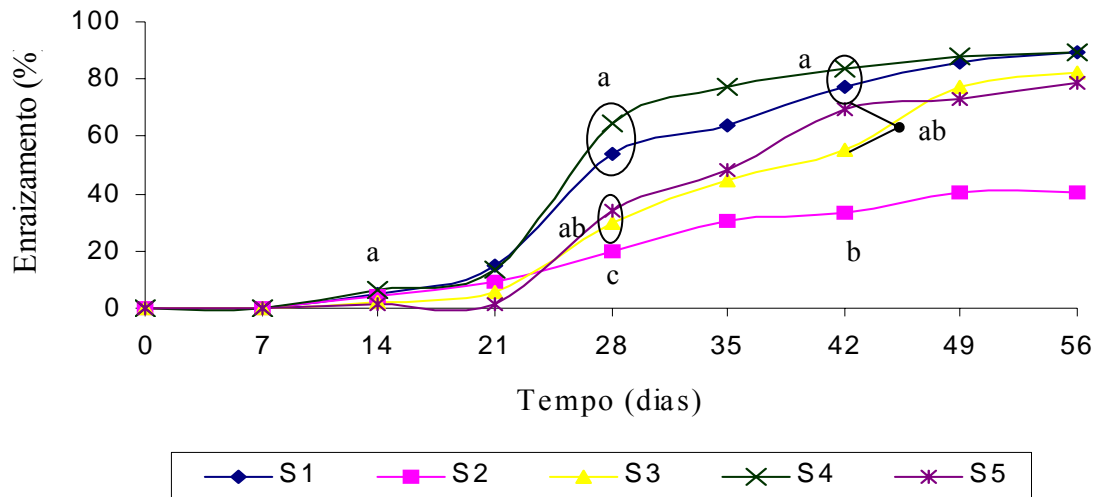


Figura 5. Formação de raízes em segmentos nodais caulinares de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, ao longo de 56 dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2% de sacarose.

Na Figura 6 são apresentadas plantas completas, produzidas a partir da morfogênese ocorrida nos segmentos nodais caulinares dos somaclones S2 e S4 em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento.

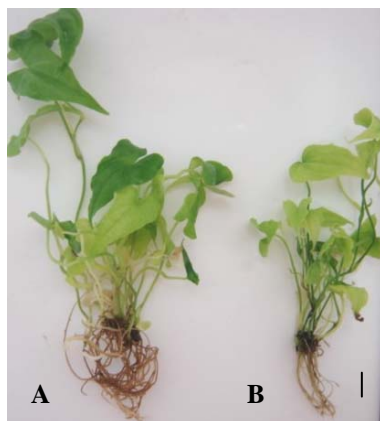


Figura 6: Plantas enraizadas dos somaclones S4 (A) e S2 (B) de *Dioscorea composita* produzidas *in vitro*, a partir da cultura de segmentos nodais caulinares contendo gema axilar foliar, em meio Murashige & Skoog suplementado com 2% de sacarose, após 56 dias.(barra= 1cm)

2.3.2. Aclimatização de plantas dos diferentes somaclones

2.3.2.1. Análise da sobrevivência das plantas em câmara de crescimento

Os resultados da percentagem de sobrevivência das plantas dos somaclones S1, S2, S3 e S4, aclimatizadas em embalagens plásticas de 24 cm x 17 cm x 10 cm e depois transferidas para copos plásticos e mantidas em bandejas plásticas de 28 L, estão ilustrados na Figura 7A. Esses resultados indicam que após 8 semanas do início do experimento, a percentagem final de sobrevivência foi de 82,2%, 77,8%, 74,6% e 28,5%, respectivamente para os somaclones S1, S3, S4 e S2. A percentagem de sobrevivência do somaclone S2 foi significativamente inferior à dos demais somaclones, não havendo diferença entre os somaclones S1, S3 e S4.

A percentagem de sobrevivência das plantas dos diferentes somaclones, quando a aclimatização foi realizada diretamente em copos plásticos e a manutenção dos mesmos foi feita em bandejas plásticas de 28 L, é apresentada na Figura 7B. Observa-se que, após 8 semanas, as percentagens finais de sobrevivência foram de 80,6%, 61,1%, 66,7%, 76,7%, respectivamente para os somaclones S1, S2, S3 e S4. Não houve diferença entre a percentagem de sobrevivência dos somaclones.

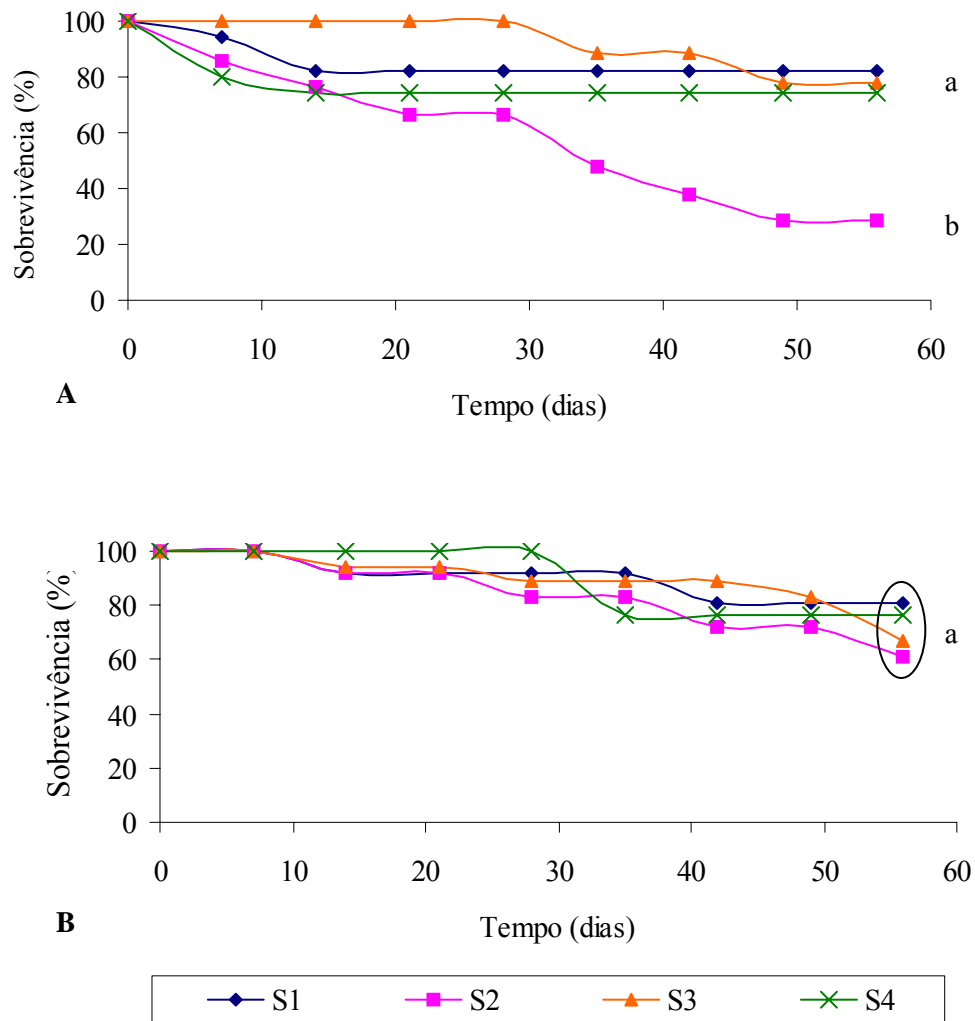


Figura 7: Sobrevivência dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, após aclimatização em bandejas plásticas de 24 cm x 17 cm x 10 cm (A) e diretamente em copos plásticos mantidos em bandejas de 28 L (B).

Diferenças no crescimento dos somaclones também puderam ser observadas, especialmente quando esses foram transferidos da sala de crescimento, onde permaneceram em condições controladas durante os 56 dias de aclimatização, para a sala com temperatura ambiente. O somaclone S2 apresentou, visualmente, menor crescimento e desenvolvimento durante as 4 semanas em que as plantas permaneceram neste novo ambiente, demonstrando pouco ou nenhum surgimento de perfilhos (Figura 8), além de ter apresentado, desde o cultivo *in vitro*, folhas de coloração verde clara, diferindo da cor verde escura apresentada pelas folhas dos demais somaclones.

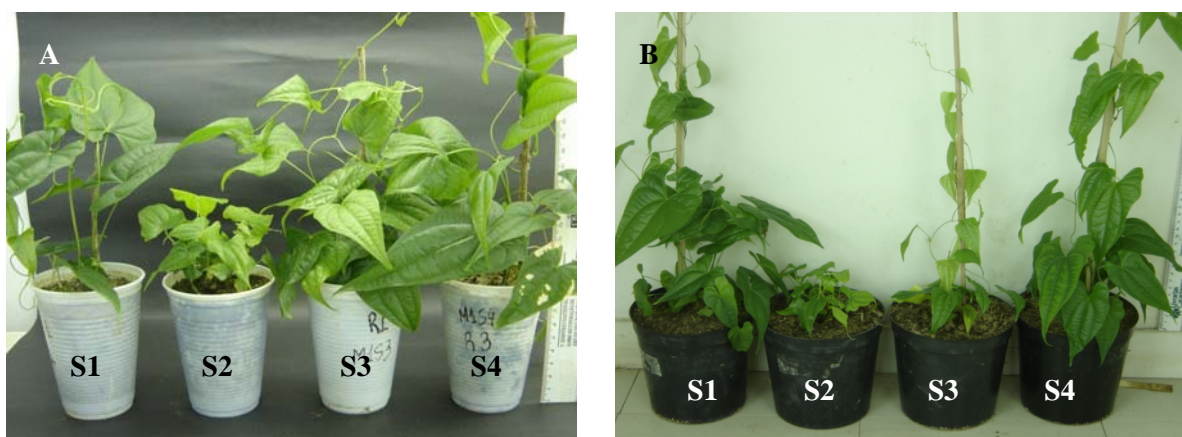


Figura 8: Aspecto geral dos somaclones de *Dioscorea composita* com 90 dias (A) e 130 dias (B) de idade.

2.3.2.2. Análise da sobrevivência e do crescimento das plantas após a transferência para a casa de vegetação

Na Tabela 2 é mostrada a percentagem de sobrevivência das plantas dos diferentes somaclones, após a transferência para a casa de vegetação, onde permaneceram por quatro meses. Observa-se que a percentagem de sobrevivência varia entre os somaclones, sendo o menor valor verificado para o somaclone S2. Os demais somaclones apresentaram alta percentagem de sobrevivência (acima de 88%), com maiores valores para os somaclones S1 e S4.

Tabela 2. Crescimento de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* micropropagadas e mantidas por quatro meses em casa de vegetação. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Sobrevivência (%)	MFA (g) ^a	MSA (g) ^a	MSA/MFA ^a	MST (g) ^a	MST/MSA ^a
S1	100	15,56 a	3,97 a	0,26 a	2,86 a	0,69 b
S2	75	2,80 b	0,63 b	0,23 a	0,86 b	1,29 a
S3	88,24	6,09 b	1,55 b	0,26 a	0,56 b	0,46 c
S4	95,83	12,51 a	3,97 a	0,27 a	2,80 a	0,85 ab

^a Médias de seis repetições (somaclone S2) e de pelo menos quinze repetições para os demais somaclones, seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MFA= massa fresca da parte aérea; MSA= massa seca da parte aérea; MST= massa seca do tubérculo.

Verifica-se, também, pela Tabela 2, que o menor crescimento ocorreu nas plantas do somaclone S2. Esse somaclone apresentou os menores valores de massas fresca e seca da parte aérea (2,80 g e 0,66 g, respectivamente). Entretanto, estes valores não diferiram dos observados para o somaclone S3, da mesma maneira que os valores de massa seca dos tubérculos, que, novamente foram os menores. Para todas estas variáveis, os maiores valores foram os encontrados para os soma clones S1 e S4. Os soma clones não diferiram com relação aos valores de razão entre massa seca e massa fresca da parte aérea, contudo o somaclone S2 foi o que apresentou a maior razão entre as massas secas do tubérculo e da parte aérea, sendo o valor (1,29) semelhante ao obtido para o somaclone S4 (0,85).

O somaclone S4 foi o que apresentou os maiores valores de massa fresca e seca dos tubérculos (7,1 g e 2,69 g, respectivamente) e o menor teor de água (62,8%), sendo os mesmos similares aos obtidos para o somaclone S1 (Tabela 3). Os menores valores de massa fresca e seca dos tubérculos foram observados para o somaclone S3 (1,59 g e 0,49 g, respectivamente), assim como o maior teor de água. Tais valores foram semelhantes aos do somaclone S2.

Tabela 3. Crescimento de tubérculos de plantas de diferentes soma clones de *Dioscorea composita* micropropagadas e mantidas por quatro meses em casa de vegetação. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Soma clones	MFT (g) ^a	MST (g) ^a	MST/MFT ^a	Teor de água (%) ^a
S1	5,35 ab	1,95 ab	0,36 ab	64,14 bc
S2	2,65 bc	0,86 bc	0,32 bc	68,15 ab
S3	1,59 c	0,49 c	0,31 c	68,99 a
S4	7,10 a	2,69 a	0,37 a	62,80 c

^a Médias de cinco repetições (somaclone S2) e de pelo menos dezessete repetições, para os demais soma clones, seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MFT= massa fresca do tubérculo; MST= massa seca do tubérculo.

2.3.3. Determinação da densidade estomática, das dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos dos somaclones S2 e S4

O número médio de estômatos.mm⁻² foi maior para o somaclone S4 (283,33 ± 86,5 estômatos.mm⁻²) do que para o somaclone S2 (215,28 ± 61,9). Porém, em termos do comprimento e largura das células-guarda, os valores observados para o somaclone S2 foram superiores (Tabela 4). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os somaclones para as dimensões do poro estomático.

Tabela 4. Densidade estomática e dimensões das células-guarda e do poro estomático de folhas dos somaclones S2 e S4 de *Dioscorea composita* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 2% de sacarose, por dois meses. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Variáveis	Somaclones	
	S2	S4
Densidade estomática (nº de estômatos.mm ⁻²) ^a	215,28 ± 61,9 b	283,33 ± 86,5 a
Comprimento da célula-guarda (µm) ^a	26,63 ± 3,2 a	24,23 ± 3 b
Largura da célula-guarda (µm) ^a	7,26 ± 1,7 a	5,81 ± 1,2 b
Comprimento do poro estomático (µm) ^a	15,55 ± 3,5 a	15,38 ± 2,5 a
Largura do poro estomático (µm) ^a	9,16 ± 1,9 a	8,35 ± 2 a

^a Médias ± desvio padrão de 32 repetições para densidade estomática e de 40 repetições para dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos, seguidas pelas mesmas letras na mesma linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

2.4. DISCUSSÃO

O estudo sobre o crescimento dos diferentes somaclones de *D. composita* mostrou grande variação na percentagem de brotação e de enraizamento. Em *D. zingiberensis*, Chen *et*

al. (2003), obtiveram 74,1% de brotação dos segmentos nodais em meio MS sem adição de reguladores de crescimento, após 20 dias de cultivo. No mesmo trabalho, a maior percentagem de brotação observada foi em meio de cultura MS, suplementado com 4,4 μM de BAP e 1,1 μM de ANA, resultando em 88,9% de segmentos nodais com ramos desenvolvidos. Esses resultados refletem a variação nas respostas para uma mesma variável e as diferentes necessidades fisiológicas dentro do gênero *Dioscorea*. Pode-se inferir que os diferentes somaclones de *D. composita*, ao contrário de *D. zingiberensis*, possuem concentração endógena de hormônios suficiente para desencadear elevadas percentagens de brotação e de desenvolvimento das gemas axilares, o que parece não ocorrer com *D. zingiberensis*, cuja necessidade de reguladores de crescimento exógenos, para a formação de ramos, foi registrada nos resultados obtidos por Chen *et al.* (2003). O mesmo raciocínio pode ser aplicado para explicar a diferença na capacidade de enraizamento dos somaclones de *D. composita*. O fato de a rizogênese ocorrer em altas percentagens e na ausência de reguladores de crescimento, para a maioria dos somaclones estudados, representa uma diminuição dos custos de produção em escala comercial. Normalmente, meios de cultura específicos para induzir o enraizamento devem ser desenvolvidos, para a maioria das espécies, o que torna o processo da micropropagação mais trabalhoso e caro.

O número de nós produzidos por planta, em particular, é uma importante variável de crescimento, pois em cada nó há gemas axilares, que podem se desenvolver, quando inoculadas em meio de cultura e originar novas plantas. Esta variável pode, portanto, ser utilizada para estimar as taxas de multiplicação dos somaclones, indicando o potencial de propagação vegetativa dos mesmos para uma possível produção de plantas em escala comercial, para o cultivo e produção da diosgenina. A propagação através da cultura de segmentos de caule, como os segmentos nodais, é um dos métodos mais favoráveis para melhor preservação e multiplicação de genótipos superiores de plantas, uma vez que

normalmente a habilidade de regeneração não é perdida com o tempo, pois as gemas axilares ou apicais estão pré-formadas. Somados a isto, os segmentos de caule são fáceis de manter em condições de luz e sem a adição de reguladores de crescimento (Malmberg *et al.*, 1985) ou, ainda, podem ser conservados por determinados períodos de tempo encapsuladas em alginato de sódio, como demonstrado para *Malus pumila* (Sicurari *et al.*, 2001) e espécies florestais como *Cedrela fissilis* (Nunes *et al.*, 2002).

Lauzer *et al.* (1992), quando estudaram a propagação *in vitro* de duas espécies do gênero *Dioscorea*, obtiveram de 2 a 3 nós para cada ramo de *D. abyssinica* e de 12 a 14 nós para cada ramo de *D. mangelotiana*, após 45 dias de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com ANA (0,5 μM), BAP (4,4 ou 8,9 μM , dependendo da espécie) e sacarose 3%. Borges *et al.* (2004), pesquisando a regeneração e multiplicação *in vitro* de *D. alata*, obtiveram, após 60 dias de cultivo, média de 3 nós por planta em meio D-571 (De la Cruz *et al.*, 1992), suplementado com manitol em diferentes concentrações (1,5; 3,5 e 5,5%), BAP 0,1 e 1 mg.L^{-1} , na presença e ausência de carvão ativado. No presente trabalho, é importante salientar que o número máximo de nós variando de 3,9 a 5,8 nós por planta, dependendo do somaclone, foi conseguido na ausência de reguladores de crescimento, o que é um fato positivo, pois as culturas não são expostas a reguladores de crescimento, que podem induzir possíveis variações genéticas nas plantas.

O cultivo *in vitro* de *D. composita* foi estudado por Alizadeh *et al.* (1998), sob diferentes concentrações de sacarose e reguladores de crescimento. O efeito da sacarose no número de nós por planta foi maior quando a concentração utilizada no meio de cultura foi de 8 e 10% e com a adição de 2,5 μM de cinetina, quando os autores obtiveram as médias de 17 e 16 nós por planta, respectivamente, após 8 meses de cultura. Quando se utilizou sacarose a 2%, o número de nós foi reduzido, sendo de apenas 8 nós por planta. Entretanto, este número ainda é superior ao obtido no presente trabalho, sugerindo que a presença da cinetina, no meio

de cultura utilizado por esses autores, tenha sido responsável pelas diferenças. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram os diferentes padrões de crescimento das espécies do gênero *Dioscorea*, resultado da grande dispersão de ocorrência deste gênero, sendo encontrado em quase todos os continentes. Também pode resultar das exigências específicas em seu ciclo de vida, até mesmo dentro da própria espécie, evidenciando a necessidade, muitas vezes, de reguladores de crescimento para uma maior obtenção de nós por planta.

O número de folhas produzidas por planta foi uma variável também analisada por Alizadeh *et al.* (1998) em plantas de *D. composita*, sendo observada uma média de 9 folhas por planta cultivada em meio MS com sacarose 2%. Chu & Figueiredo-Ribeiro (2002) também utilizaram esta variável em seus estudos com plantas de *D. bulbifera*, *D. delicata* e *D. olfersiana*, sob a influência de diferentes fotoperíodos. Para o fotoperíodo de 12 horas, que os autores denominaram neutro, *D. bulbifera*, *D. delicata* e *D. olfersiana* apresentaram média de 3,0; 3,2 e 3,3 folhas por planta, respectivamente. Este resultado é inferior ao encontrado para os diferentes somaclones de *D. composita* neste trabalho, sendo importante ressaltar que, neste caso, as plantas foram produzidas sob fotoperíodo de 16 horas. No contexto do presente trabalho, a avaliação do número de folhas é uma variável importante, pois nas folhas de várias espécies de *Dioscorea*, a hidrólise da sacarose é acompanhada pelo aumento na quantidade de frutose e glucose (Kouassi *et al.*, 1990), o que acarreta a síntese de diosgenina. De acordo com Sttaford & Warren (1991), a síntese de diosgenina resulta da via do ácido mevalônico, a qual está ligada à via glicolítica. Além disso, as espécies de *Dioscorea* produtoras de diosgenina têm, provavelmente, esta produção iniciada nas folhas e somente após, este metabólito secundário ser translocado e armazenado nos tubérculos. O fato de não terem sido detectadas diferenças entre o número de folhas produzidas pelas plantas dos diferentes somaclones de *D. composita* é de fundamental importância, pois todos os somaclones não

parecem apresentar limitações provocadas pelo menor desenvolvimento da parte aérea da planta.

As raízes são importantes para a realização de atividades essenciais do metabolismo vegetal, uma vez que a ramificação intensa dos sistemas radiculares gera uma formidável superfície de contato com o solo, a qual é multiplicada pela formação dos pêlos absorventes. Esta superfície de contato com o solo, adquirida pela quantidade suficiente de raízes, é importante para os sistemas de micropropagação, especialmente na fase de aclimatização, quando as plantas produzidas *in vitro* começam a absorver, de maneira mais ativa, os nutrientes do solo, os quais se encontram em menor disponibilidade que no meio de cultura. O fato de o somaclone S2 apresentar a menor percentagem de enraizamento *in vitro* pode sugerir implicações na capacidade de aclimatização deste, além de diminuir a eficiência da produção em larga escala e indicar a necessidade do direcionamento de esforços para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de enraizamento para este somaclone. Fato interessante foi observado ao analisar-se a percentagem de enraizamento das plantas dos diferentes somaclones, ao longo dos 56 dias de cultivo *in vitro*, pois os resultados indicam a necessidade de se manterem as culturas *in vitro* por um tempo mais prolongado para que a percentagem máxima de enraizamento seja alcançada e para que a fase posterior de aclimatização, em que a emissão de raízes é de suma importância para a sobrevivência da planta, não seja afetada.

As diferenças apresentadas na morfogênese e no crescimento *in vitro* das plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*, iniciadas a partir da cultura de segmentos nodais caulinares, são evidentes. Essas diferenças indicam que a falta de uniformidade nas respostas dos somaclones pode ter base na variação somaclonal. De acordo com Jain (2001), a variação somaclonal pode ser causada por inúmeros fatores, dentre eles a cultura de calos por vários ciclos e a regeneração de um grande número de plantas cultivadas por longo período. A cada

subcultura, as células devem se reprogramar e se reestruturar e esses eventos podem gerar variação somaclonal nas plantas produzidas novamente (Jain, 2000). Estes fatores podem explicar as diferenças observadas nas plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*, que foram obtidas a partir da regeneração de calos, produzidos na presença de 2,4-D. A indução e a exploração da variação somaclonal em sistemas de regeneração de plantas a partir de calos, contudo, é uma forma interessante de gerar e ampliar a variabilidade genética, o que pode significar o desenvolvimento de plantas com maior capacidade de tuberização e produção de diosgenina.

As diferenças encontradas entre os somaclones, em termos da sobrevivência durante a aclimatização podem, também, ser consequência de variação somaclonal. As condições fisiológicas e anatômicas das plantas obtidas por cultura de tecidos *in vitro* também são importantes para o estabelecimento e sobrevivência destas quando transferidas das condições *in vitro* para as condições *in vivo*. O desenvolvimento do sistema radicular exerce papel fundamental no sucesso da aclimatização. O menor desenvolvimento do somaclone S2 pode estar relacionado com o pouco desenvolvimento de seu sistema radicular. Kadlecsek *et al.* (2001), propõem possíveis danos ao sistema radicular, causados durante o processo de transferência das plantas para a situação *in vivo*. Estes danos ocasionariam dificuldade na absorção de água e de nutrientes do solo e, como consequência, dificuldade na aclimatização.

As plantas dos diferentes somaclones apresentaram alta percentagem de sobrevivência quando transferidas para casa de vegetação, última etapa da fase de aclimatização. Este resultado mostra a capacidade de adaptação das plantas a um novo ambiente, e a importância do processo de aclimatização em bandejas plásticas, uma vez que as plantas foram, gradualmente, se ajustando às novas condições de luminosidade, temperatura e umidade relativa que encontraram na casa de vegetação. A menor massa fresca e seca da parte aérea das plantas do somaclone S2 pode ser consequência da pouca ou nenhuma formação de

perfilhos observada para este somaclone. O mesmo resultado, para estas duas variáveis, foi observado nas plantas do somaclone S3, entretanto, este somaclone apresentou, visualmente, desenvolvimento normal dos perfilhos.

Os resultados sobre os menores valores de massa fresca e seca dos tubérculos das plantas dos somaclones S2 e S3, em relação às do somaclone S4, sugerem que sejam devidos a dois fatos: menor massa fresca e seca da parte aérea ou ao maior teor de água encontrado nos tubérculos. Além disso, é possível que, nas plantas dos somaclones S2 e S3, os compostos sintetizados nas partes aéreas estariam sendo utilizados antes de serem armazenados nos órgão subterrâneos, acarretando a diminuição das massas frescas e secas dos tubérculos.

O estresse causado pelo déficit hídrico, durante o processo de aclimatização, está diretamente relacionado com a baixa percentagem de sobrevivência de muitas espécies, quando transferidas para casa de vegetação. Diferenças na anatomia foliar de cada somaclone podem estar relacionadas com a perda de água e com as diferentes respostas dos somaclones à aclimatização. A perda de água pelas folhas pode se dar através dos estômatos ou pela cutícula. A cutícula, membrana composta por uma cutina matriz, juntamente com ceras internas e superficiais, protege os tecidos das plantas, limitando a perda de água por transpiração. Folhas de plantas cultivadas *in vitro* possuem uma camada mínima ou inexistente de cera protetora (Tombolato & Costa, 1998). Essa carência de ceras em plantas cultivadas *in vitro* permite uma perda de água excessiva, resultando na dessecação, que pode levar a danos e diminuir a taxa de sobrevivência das plantas (Sutter, 1985). Isto ocorre devido à exposição das plantas às alterações bruscas nas condições ambientais, pois são características da cultura *in vitro*, a baixa intensidade luminosa e a alta umidade relativa do ar.

Nas condições *in vitro*, os estômatos apresentam-se pouco funcionais, ocasionando dificuldade no controle da abertura e fechamento destes, quando transferidos para condições *in vivo*. Esta hipótese estimulou a realização do experimento para a determinação da

densidade estomática e das dimensões das células-guarda e dos poros estomáticos dos somaclones S2 e S4, que apresentaram diferenças entre a percentagem de sobrevivência. Os resultados indicaram haver variação somaclonal entre as plantas desses dois somaclones, sugerindo que a característica de maior densidade estomática de S4 associada às características das dimensões das células-guarda, pode ter resultado em maior eficiência fisiológica. Assim, este pode ter sido um dos fatores responsáveis pela melhor aclimatização do somaclone S4.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles obtidos em estudos conduzidos com outras espécies, os quais mostram que há uma relação inversa entre o tamanho do estômato e a densidade estomática (Muchow & Sinclair, 1989; Romero-Aranda *et al.*, 1994). Conforme Larcher (2000), a diminuição da transpiração é influenciada, também, pela distância entre os estômatos. A maior proximidade dos estômatos faz com que ocorram arcos de transpiração, ou seja, a formação de um microclima ocasionado pela maior umidade próxima aos estômatos. O mesmo autor conclui, ainda, que a diferença entre a densidade estomática e as dimensões das células-guarda pode ser consequência das adaptações das plantas às condições locais nas quais se encontram. Essas características variam de espécie para espécie, podendo ocorrer diferenças mesmo entre os indivíduos de uma mesma espécie. A densidade estomática também depende das divisões e diferenciações celulares, podendo os diversos ciclos da cultura de tecidos *in vitro* terem influenciado na morfogênese destes somaclones. Possíveis variações genéticas podem ser a causa da diferença nos tamanhos das células-guarda dos somaclones de *D. composita*. Masterson (1994), em seus estudos com plantas fossilizadas, mostra que a poliploidia, definida como um aumento no número de cromossomos (Torres *et al.*, 2000), aumenta o tamanho celular. Este evento genético poderia estar sendo verificado nas plantas do somaclone S2. As diferenças encontradas no

comprimento e na largura das células-guarda dos dois somaclones não influenciaram as dimensões do poro estomático.

A diferença visual na coloração das folhas do somaclone S2, quando comparado com os demais somaclones, pode ser explicada pela possível carência de pigmentos fotossintéticos. Geralmente plantas cultivadas sob baixa intensidade luminosa, tais como o que ocorre sob condições *in vitro*, tendem a priorizar a síntese de clorofila de forma a propiciar maior absorção de luz (Taiz & Zeiger, 2004). Porém, com a variação somaclonal observada neste trabalho é possível inferir que a rota de biossíntese da clorofila para o somaclone S2 possa ter sofrido alguma alteração que não permitiu que as células deste somaclone pudessem completar a síntese das clorofilas. Além disso, a presença de transposons, série de elementos genéticos que podem ocasionalmente ser transportada de uma posição para outra no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, ou serem também inseridos em regiões específicas de expressão de pigmentos, podem fazer com que esta inserção interfira com a função de um gene codificador para o pigmento clorofila (Marcotrigiano, 1997) acarretando, assim, numa deficiência do somaclone S2 para a captação de luz e realização da fotossíntese, contribuindo para a baixa percentagem de sobrevivência observada.

2.5. CONCLUSÕES

1. Os segmentos de caule contendo a gema axilar dos diferentes somaclones apresentam diferenças quanto à capacidade de morfogênese (formação de novos ramos e enraizamento) *in vitro*.

2. As plantas micropropagadas dos diferentes somaclones apresentam padrões diferentes de crescimento, quando cultivadas em meio de cultura e quando aclimatizadas em casa de vegetação.

3. A aclimatização em bandejas plásticas (24 cm x 17 cm x 10 cm) proporciona diferenças na percentagem de sobrevivência dos diferentes somaclones, o que não é observado durante a aclimatização em copos plásticos mantidos em bandejas de 28 L. Pela praticidade e eficiência recomenda-se a aclimatização nesta última condição.

4. As diferenças nas variáveis anatômicas (densidade estomática e dimensões das células guarda dos estômatos) indicam ser a causa da baixa percentagem de sobrevivência e do crescimento do somaclone S2 em relação aos demais.

5. Plantas completas dos diferentes somaclones são produzidas *in vitro* em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento e aclimatizadas com sucesso.

CAPÍTULO 3

MORFOGÊNESE E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE SOMACLONES DE *D. composita* NA PRESENÇA DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO.

3.1. INTRODUÇÃO

A morfogênese e o crescimento *in vitro* são extremamente influenciados pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. Além disso, a composição do meio de cultura, englobando os nutrientes e os reguladores de crescimento (tipo e concentração), entre outros fatores, influenciam os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*. Por isso, a composição química adequada de um meio de cultura é um aspecto bastante importante na cultura de tecidos vegetais, pelo fato de influenciar diretamente no processo de morfogênese e crescimento.

Neste contexto, o uso de reguladores de crescimento e de fontes nitrogenadas no meio de cultura é, muitas vezes, responsável pelo desenvolvimento da parte aérea e radicular, bem como dos microtubérculos de plantas de *Dioscorea*.

Os reguladores de crescimento agem como moléculas sinalizadoras responsáveis por vários efeitos no desenvolvimento do vegetal (Taiz & Zeiger, 2004), sendo definidos como compostos que, em baixas concentrações, regulam os processos fisiológicos das plantas, principalmente o crescimento e o desenvolvimento. São necessários para o crescimento e

desenvolvimento de tecidos caulinares isolados, que ao contrário das raízes, desenvolvem-se pouco em meio nutritivo sob ausência de reguladores de crescimento (Taiz & Zeiger, 2004). Estes mesmos autores sugerem que haja uma relação entre a parte aérea e a radicular, podendo alguns fatores derivados das raízes regular o crescimento da parte aérea.

O desenvolvimento vegetal pode ser regulado pelas diferentes classes de reguladores de crescimento. No presente capítulo, estudou-se apenas a influência de três classes de reguladores de crescimento: as auxinas, as citocininas e as giberelinas. As auxinas e as citocininas, ao contrário dos demais hormônios vegetais e agentes de sinalização, são necessárias para a sobrevivência do vegetal, não sendo encontrado ainda nenhum mutante com deficiência em auxina e citocinina, sugerindo que esta deficiência seja letal (Taiz & Zeiger, 2004). As giberelinas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos vegetais, especialmente na divisão e alongamento celular (Arteca, 1996).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ácido giberélico, auxinas (ANA, AIB) e citocininas (BAP e 2iP) sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro* de plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Origem do material vegetal e manutenção dos estoques dos diferentes somaclones de *D. composita*

Foram utilizadas plantas de *Dioscorea composita* Hemsl regeneradas de um único calo produzido a partir da cultura de embrião zigótico, segundo a metodologia descrita por Viana & Mantell (1989). Estas plantas, denominadas somaclones S1, S2, S3, S4, S5, foram isoladas do calo e multiplicadas, durante 60 dias, através da cultura de segmentos nodais caulinares contendo gema axilar foliar em meio de cultura MS (Sigma, Co.) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose 2% (p/v) e Phytigel® (Sigma, Co.) a 0,2% (p/v). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 M ou HCl 1 N, antes da autoclavagem, sendo distribuídos 8 mL de meio em cada tubo de ensaio (25 mm x 150 mm), fechados com tampas de polipropileno, autoclavados durante 18 minutos a 1,1 Kgf.cm⁻², em temperatura de 121°C. Após a inoculação, cada tubo foi fechado com um filme de polipropileno (72 mm x 72 mm), preso com elástico de borracha e com uma tira de filme de PVC.

As culturas dos diferentes somaclones foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada (25°C ± 2°C), sob fotoperíodo de 16 horas fornecido por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, com fluxo de fótons de 22,3 µmol.m⁻².s⁻¹ e umidade relativa de 70%. Estas condições de cultura foram utilizadas em todos os experimentos descritos a seguir, exceto quando outras condições foram requeridas.

3.2.2. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

Foram utilizadas plantas inteiras dos diferentes somaclones com idades entre 77 e 90 dias, cultivadas nas condições descritas no item 3.2.1. As plantas foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura MS, em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm), suplementado com 8% de sacarose e 0,2% de Phytigel e com 5 µM dos seguintes reguladores de crescimento, utilizados

isoladamente: ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), 6-benzilaminopurina (BAP), 6- γ - γ -(dimetilamina) purina (2iP) e ácido giberélico (GA₃). O meio de cultura testemunha não continha reguladores de crescimento.

Após 4 meses, as culturas foram avaliadas quanto à percentagem de formação de ramos, de raízes, de microtubérculos, de bulbilhos aéreos. O crescimento das culturas foi avaliado pela determinação da massa seca da parte aérea, das raízes e dos microtubérculos, número de nós, de gemas e de folhas. A partir desses dados foi calculado o teor de água dos microtubérculos, assim como a razão massa seca/massa fresca da parte aérea, dos microtubérculos e a razão massa seca do tubérculo/massa seca da parte aérea. Foram utilizadas 12 repetições de cada somaclone para cada regulador de crescimento.

3.2.3. Determinação da massa seca das plantas

Após a determinação da massa fresca, as partes aéreas, os microtubérculos e as raízes das plantas produzidas em cada tratamento foram colocadas em embalagens de papel e mantidas em estufa por pelo menos 48 horas a 85°C. O teor de água dos microtubérculos foi expresso em percentagem da massa fresca e determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{Teor de água (\% da massa fresca)} = (\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / \text{massa fresca} * 100.$$

Esta metodologia foi utilizada em todos os experimentos descritos a seguir, exceto quando outras condições foram requeridas.

3.2.4. Análise estatística

Os experimentos obedeceram a um delineamento estatístico completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (Gomez & Gomez, 1984). Quando necessário, alguns dados foram submetidos ao teste t , ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (Sokal & Rohlf, 1969).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Efeito dos reguladores de crescimento sobre a morfogênese das plantas dos diferentes somaclones

Plantas dos diferentes somaclones apresentaram quatro diferentes respostas de morfogênese: formação de ramos, formação de raízes, tuberização e/ou formação de bulbilhos aéreos, em função do tratamento (Tabela 1). A percentagem de senescência das plantas foi maior para o somaclone S2, em todos os tratamentos. No tratamento com o AIB, este valor alcançou 66,7%. Além disso, todas as plantas desse somaclone, que sobreviveram, formaram ramos, raízes e microtubérculos. Da mesma forma, em todos os demais somaclones, em todos os tratamentos, a percentagem de explantes que formaram ramos e raízes foi de 100%. Não foi observada senescência para o somaclone S3. Para o somaclone S1, a percentagem máxima de senescência observada foi de 8,3% para o GA₃ e 2iP, enquanto que para o somaclones S4 e

S5, os valores observados foram respectivamente de 8,3%, para o AIB e 16,7%, para a testemunha.

Tabela 1. Morfogênese das plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* cultivadas por 12 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou na presença de 5µM de diferentes reguladores de crescimento. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Reguladores de crescimento	Ramos (%)	Raízes (%)	Tuberização (%)	Bulbilhos Aéreos (%)	Senescência (%)
S1	GA3	100	100	100	8,3	8,3
	ANA	100	100	100	8,3	0
	AIB	100	100	100	16,7	0
	BAP	100	100	83,3	0	0
	2iP	100	100	100	0	8,3
	Testemunha	100	100	100	0	0
S2	GA3	100	100	100	25	0
	ANA	100	100	100	8,3	25
	AIB	100	100	100	8,3	66,7
	BAP	100	100	100	0	8,3
	2iP	100	100	100	0	16,7
	Testemunha	100	100	100	16,7	16,7
S3	GA3	100	100	100	8,3	0
	ANA	100	100	92	0	0
	AIB	100	100	100	0	0
	BAP	100	100	50	0	0
	2iP	100	100	100	0	0
	Testemunha	100	100	100	0	0
S4	GA3	100	100	100	8,3	0
	ANA	100	100	100	8,3	0
	AIB	100	100	100	0	8,3
	BAP	100	100	83,3	0	0
	2iP	100	100	100	0	0
	Testemunha	100	100	100	8,3	0
S5	GA3	100	100	100	41,7	0
	ANA	100	100	100	0	0
	AIB	100	100	100	16,6	0
	BAP	100	100	66,7	0	0
	2iP	100	100	100	0	0
	Testemunha	100	100	100	8,3	16,7

Com relação à indução de microtubérculos, ainda na Tabela 1, observa-se que, para os somaclones S1, S4 e S5, houve redução na percentagem de culturas que formaram microtubérculos, apenas nos tratamentos com BAP. Em todos os demais tratamentos, incluindo a testemunha, 100% das plantas inoculadas sofreram indução. Verifica-se que o

BAP promoveu a menor percentagem de indução de microtubérculos nas plantas dos diferentes somaclones, inclusive quando comparado com os meios de cultura sem reguladores de crescimento. Entretanto, para o somaclone S2, o BAP foi eficiente, e todas as plantas deste somaclone, em meio de cultura contendo BAP induziram microtubérculos. Para o somaclone S3, este regulador de crescimento teve eficiência bastante reduzida na indução de microtubérculos e apenas 50% das plantas produziram microtubérculos. Já para o somaclone S2, verificou-se que em todos os tratamentos houve 100% de indução e que, para o somaclone S3, a percentagem de indução com ANA também foi reduzida para 92%.

A formação de bulbilhos aéreos ocorreu em todos os somaclones no tratamento com GA₃, sendo a maior percentagem observada para o somaclone S5 (41,7%). O ANA induziu a formação de bulbilhos aéreos apenas nos somaclones S1, S2 e S4, enquanto que na presença de AIB, apenas os somaclones S1, S2 e S5 responderam. Já na ausência de reguladores de crescimento, apenas os somaclones S2, S4 e S5 apresentaram bulbilhos aéreos. O BAP e o 2iP não induziram a formação de bulbilhos aéreos em qualquer dos somaclones, estimulando até certa inibição, uma vez que na ausência de reguladores de crescimento, os somaclones S2, S4 e S5 formaram bulbilhos aéreos.

3.3.2. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento dos microtubérculos

Para cada somaclone o crescimento dos microtubérculos foi diferente dependendo do regulador de crescimento utilizado (Tabela 2). Todos os reguladores de crescimento foram eficientes em promover o crescimento dos microtubérculos, quando comparados com as testemunhas.

Tabela 2. Efeito de reguladores de crescimento sobre o crescimento e teor de água de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Reguladores de crescimento	Somaclones	MST (mg) ^a	MST/MFT ^a	MST/MSA ^a	Teor de água (% MFT) ^a
GA ₃	S1	161,2 a	0,26 ab	2,01 a	73,1 de
ANA		166,2 a	0,16 e	1,11 b	83,7 a
AIB		145,6 ab	0,22 cd	1,04 b	78,05 bc
BAP		66,4 c	0,19 de	0,66 b	80,6 ab
2iP		117,7 abc	0,30 a	1,12 b	69,7 e
Testemunha		79,7 bc	0,24 bc	0,60 b	75,3 cd
GA ₃	S2	101,8 c	0,25 a	1,35 c	74,8 c
ANA		262,2 a	0,15 c	3,76 abc	84,8 a
AIB		199,7 ab	0,17 bc	4,25 abc	82,23 ab
BAP		197,6 ab	0,15 c	4,50 ab	84,66 a
2iP		185,3 ab	0,22 ab	5,64 a	77,58 bc
Testemunha		140,1 bc	0,24 a	1,54 bc	76,1 c
GA ₃	S3	48,7 b	0,24 a	0,6 bc	76,1 c
ANA		123,3 a	0,2 bc	1,47 a	79,5 ab
AIB		99,3 a	0,22 ab	0,93 abc	77,9 bc
BAP		17,7 b	0,18 c	0,23 c	81,7 a
2iP		101,4 a	0,22 ab	1,22 ab	77,7 bc
Testemunha		58,2 b	0,23 ab	0,62 bc	76,5 bc
GA ₃	S4	122,8 ab	0,26 a	1,79 a	73,3 b
ANA		150,2 a	0,18 b	1,12 ab	81,64 a
AIB		152,1 a	0,23 ab	1,13 ab	77,07 ab
BAP		65,4 b	0,20 b	0,91 b	79,8 a
2iP		120,7 ab	0,27 a	1,09 ab	72,5 b
Testemunha		80,9 b	0,26 a	0,58 b	73,5 b
GA ₃	S5	163,6 a	0,27 a	2,53 a	72,7 c
ANA		128,8 ab	0,22 bc	1,11 b	77,9 ab
AIB		95,9 b	0,25 ab	0,64 b	74,7 bc
BAP		63,4 b	0,18 c	0,73 b	81,8 a
2iP		114,8 ab	0,24 ab	2,05 a	75,2 bc
Testemunha		67,4 b	0,27 ab	0,49 b	72,9 bc

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MST= massa seca do microtubérculo; MFT= massa fresca do microtubérculo; MSA= massa seca da parte aérea.

Para o somaclone S1, GA₃ e ANA promoveram a maior massa seca quando comparados com o BAP e a testemunha. Porém, a razão entre a massa seca e a massa fresca dos microtubérculos foi bastante inferior à testemunha quando o somaclone S1 foi inoculado em meio contendo ANA. Como consequência, o maior teor de água (83,7%) foi encontrado nos microtubérculos deste somaclone em presença de ANA. O contrário ocorreu quando o

somaclone S1 foi inoculado em meio de cultura contendo 2iP, que originou a maior razão entre a massa seca e a massa fresca dos microtubérculos (0,30) e apresentou o menor teor de água (69,7%), sendo inferior, inclusive, em relação à testemunha. Apenas o GA₃ promoveu o maior valor de razão entre a massa seca do microtubérculo e massa seca da parte aérea (2,01) quando comparado a todos os demais tratamentos.

Para o somaclone S2, a maior massa seca dos microtubérculos foi observada na presença de ANA (262,2 mg), mas este resultado diferiu apenas dos obtidos com o GA₃ e a testemunha. Na presença do GA₃ e na testemunha, o somaclone S2 apresentou os maiores valores de razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculos e estes valores diferiram dos obtidos com ANA, AIB e BAP. Os reguladores que estimularam o aumento da massa seca dos microtubérculos foram os mesmos que promoveram os maiores valores de razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea, com destaque para o 2iP, cuja razão foi de 5,64. O GA₃, por outro lado, foi o regulador de crescimento com o qual foi observada a menor razão. O teor de água encontrado nos microtubérculos do somaclone S2 foi maior para os reguladores que induziram a menor razão entre a massa seca e a massa fresca dos microtubérculos, ou seja, ANA e BAP. Os valores obtidos para estes tratamentos diferiram apenas do GA₃, 2iP e da testemunha.

Os reguladores de crescimento ANA, AIB e 2iP promoveram o crescimento em massa seca dos microtubérculos do somaclone S3, em relação aos demais tratamentos. A presença de BAP no meio de cultura tornou a razão entre a massa seca e a massa fresca dos microtubérculos inferior à testemunha e aos demais reguladores de crescimento, com exceção do ANA. Em meio contendo ANA, o somaclone S3 apresentou o maior valor da razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea (1,47), sendo que este valor diferiu do GA₃, BAP e testemunha. Os maiores teores de água foram verificados nos microtubérculos

formados na presença de BAP (81,7%) e ANA (79,5%) e os menores teores nos demais tratamentos.

Para o somaclone S4, o AIB e o ANA produziram os maiores valores de massa seca dos microtubérculos (152,1 e 150,2 mg, respectivamente), quando comparados com o BAP (65,4 mg) e com a testemunha (80,9 mg). Este somaclone apresentou os valores de razão entre as massas secas e frescas dos microtubérculos inferiores ao controle quando inoculado em meio contendo ANA (0,18) e BAP (0,20) e, conseqüentemente, os maiores teores de água quando na presença destes mesmos reguladores de crescimento. Os menores valores de razão entre as massas secas do microtúbérculo e da parte aérea foram observados na presença de BAP (0,91) e na testemunha (0,58), mas estes valores diferiram apenas do obtido com o GA₃.

O somaclone S5 apresentou maior massa seca dos microtubérculos na presença de GA₃ no meio de cultura (163,6 mg). Entretanto, este valor não diferiu dos obtidos com ANA e 2iP. A razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculos foi menor em meio de cultura com BAP (0,18) do que nos tratamentos com GA₃, AIB, 2iP e a testemunha. Não foram observadas diferenças entre os valores da razão das massas secas dos microtubérculos e das partes aéreas obtidos com as auxinas e a testemunha. Apenas com o GA₃ e 2iP foram obtidos valores maiores. O teor de água presente nos microtubérculos do somaclone S5 foi maior na presença de BAP (81,8%), mas não diferiu do obtido na presença de ANA.

As plantas responderam de maneira variada ao estímulo de um mesmo regulador de crescimento ou à ausência dos mesmos (Tabela 3).

Tabela 3. Influência dos somaclones sobre o crescimento e teor de água de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Reguladores de crescimento	MST (mg) ^a	MS/MF ^a	MST/MSA ^a	Teor de água (% MF) ^a
S1	GA ₃	161,2 a	0,26 ab	2,01 ab	73,1 ab
S2		101,8 ab	0,25 ab	1,35 bc	74,8 ab
S3		48,7 b	0,24 b	0,63 c	76,1 a
S4		122,8 a	0,26 ab	1,79 ab	73,3 ab
S5		163,6 a	0,27 a	2,53 a	72,7 b
S1	ANA	166,3 b	0,16 bc	1,1 b	83,7 ab
S2		262,2 a	0,15 c	3,8 a	84,8 a
S3		123,4 b	0,21 ab	1,5 b	79,5 bc
S4		150,2 b	0,18 abc	1,1 b	81,6 abc
S5		128,8 b	0,22 a	1,1 b	77,9 c
S1	AIB	145,6 ab	0,22 ab	1,04 b	78,05 ab
S2		199,7 a	0,17 b	4,25 a	82,2 a
S3		99,3 b	0,22 ab	0,93 b	77,9 ab
S4		152,1 ab	0,23 ab	1,13 b	77,1 ab
S5		95,9 b	0,25 a	0,64 b	74,7 b
S1	BAP	66,4 b	0,19 a	0,66 b	80,6 a
S2		197,6 a	0,15 a	4,50 a	84,7 a
S3		17,7 b	0,18 a	0,23 b	81,7 a
S4		65,4 b	0,20 a	0,91 b	79,8 a
S5		63,4 b	0,18 a	0,73 b	81,8 a
S1	2iP	117,7 ab	0,30 a	1,12 b	69,7 c
S2		185,3 a	0,22 c	5,64 a	77,6 a
S3		101,4 b	0,22 c	1,22 b	77,7 a
S4		120,7 ab	0,27 ab	1,09 b	72,5 bc
S5		114,8 b	0,24 bc	2,05 b	75,2 ab
S1	Testemunha	79,7 b	0,24 a	0,6 b	75,3 a
S2		140,1 a	0,24 a	1,54 a	76,1 a
S3		58,2 b	0,23 a	0,62 b	76,5 a
S4		80,9 b	0,26 a	0,58 b	73,5 a
S5		67,4 b	0,27 a	0,49 b	72,9 a

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca; MST= massa seca dos microtubérculos; MSA= massa seca da parte aérea.

Na ausência de reguladores de crescimento ou na presença do BAP, o somaclone S2 apresentou os maiores valores de massa seca dos microtubérculos e de razão entre a massa seca do microtubérculo e da parte aérea. Em termos de razão massa seca/massa fresca do microtubérculo e de teor de água, também não foram observadas diferenças entre os somaclones para ambos os tratamentos. O 2iP também promoveu o maior crescimento em

massa seca dos microtubérculos do somaclone S2 (185,3 mg) em relação a S3 e S5. O mesmo resultado foi observado para a razão entre massa seca do microtubérculo e massa seca da parte aérea, mas neste caso o valor foi superior a todos os demais somaclones. Contudo, o maior valor da razão entre as massas seca e fresca do microtubérculo (0,3) e o menor teor de água foram obtidos para o somaclone S1, sendo diferentes dos somaclones S2, S3 e S5.

Quando os explantes dos diferentes somaclones foram cultivados em meio de cultura com GA₃, o somaclone S3 produziu microtubérculos com a menor massa seca, diferindo dos valores obtidos para S1, S4 e S5. A maior razão entre as massas seca e fresca do microtubérculo (0,27) e o menor teor de água (72,7%) foram observados para o somaclone S5, diferindo, porém, apenas do S3. Já a maior razão entre a massa seca do tubérculo e da parte aérea foi observada para o somaclone S5 (2,52), diferindo dos somaclones S2 e S3.

Na presença de ANA, o somaclone S2 apresentou a maior média de massa seca do microtubérculo dentre todos os somaclones. Entretanto, a maior razão entre a massa seca e fresca dos microtubérculos foi obtida para o somaclone S5 (0,22) diferindo apenas dos obtidos em S1 e S2. Em termos da razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea, verifica-se que o somaclone S2 foi superior aos demais. Da mesma forma, este somaclone apresentou maior teor de água (81,6%) do que os somaclones S3 e S5.

O AIB promoveu o maior incremento em massa seca dos microtubérculos (199,7mg). A maior razão entre massa seca do microtubérculo e da parte aérea foi observada para o somaclone S2 (4,25). O valor de massa seca diferiu dos obtidos em S3 e S5 e o valor da razão diferiu de todos os demais tratamentos. Em termos da razão entre a massa seca do microtubérculo e da parte aérea, observa-se que o somaclone S5 foi superior em relação ao S2, apresentando também o menor teor de água.

Na Tabela 4 são apresentadas as frequências das classes de massa seca dos microtubérculos produzidos pelos diferentes somaclones na presença ou ausência de reguladores de crescimento.

Tabela 4. Distribuição por classes de frequência (%) de massa seca de microtubérculos e número total de microtubérculos formados por tratamento (entre parênteses) dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Reguladores de crescimento	Classes de MST (mg)	Somaclones ^a				
		S1	S2	S3	S4	S5
GA ₃	≤ 100	18 (11)	50 (12)	100 (12)	25 (12)	33 (12)
	101-150	27	33	0	50	8
	151-200	27	17	0	17	17
	201-300	27	0	0	8	42
	> 300	0	0	0	0	0
ANA	≤ 100	8 (12)	0 (9)	36 (11)	17 (12)	8 (12)
	101-150	17	0	36	25	75
	151-200	50	11	18	50	17
	201-300	25	78	0	8	0
	> 300	0	11	0	0	0
AIB	≤ 100	25 (12)	0	42 (12)	8 (12)	58 (12)
	101-150	33	0	58	67	33
	151-200	8	50 (4)	0	0	8
	201-300	33	50	0	8	0
	> 300	0	0	0	0	0
BAP	≤ 100	80 (10)	9 (11)	100 (6)	80 (10)	75 (8)
	101-150	10	18	0	10	25
	151-200	10	18	0	10	0
	201-300	0	55	0	0	0
	> 300	0	0	0	0	0
2iP	≤ 100	36 (11)	10 (10)	50 (12)	42 (12)	36 (11)
	101-150	36	20	33	33	45
	151-200	27	30	8	17	18
	201-300	0	30	8	8	0
	> 300	0	10	0	0	0
Testemunha	≤ 100	58 (12)	17 (12)	100 (12)	75 (12)	50 (12)
	101-150	44	42	0	25	25
	151-200	0	8	0	0	0
	201-300	0	17	0	0	0
	> 300	0	0	0	0	0

^a Valores de proporções calculadas com base no número total de microtubérculos formados de, pelo menos, seis repetições. MST= massa seca dos microtubérculos.

Verifica-se que, na ausência de reguladores de crescimento, em todos os somaclones, exceto o S2, a totalidade dos microtubérculos formados apresentaram no máximo 150 mg de

massa seca. Neste tratamento o somaclone S2 foi o único que formou 30% dos microtubérculos com maior massa seca, entre 151 mg e 300 mg. Entretanto, na presença de GA₃, os somaclones S1, S4 e S5 apresentaram 54%, 25% e 59% dos microtubérculos nesta classe de massa seca, respectivamente. Contudo, no somaclone S2 83% dos microtubérculos tiveram massa seca menor que 150 mg e apenas 17% deles alcançaram no máximo massa seca entre 151 mg e 200 mg. Todos os microtubérculos formados pelo somaclone S3, na presença de GA₃, apresentaram massa seca menor que 100 mg.

Na presença de ANA os somaclones S1, S2 e S4 apresentaram, respectivamente, 75%, 100% e 58% dos microtubérculos com massa seca entre 151 e 300 mg, sendo que o S2 não formou microtubérculos menores que 151 mg e 11% deles tinham massa seca superior a 300 mg. Por outro lado, os somaclones S3 e S5 não formaram microtubérculos com massa seca superior a 200 mg. Com o AIB 100% dos microtubérculos do somaclone S3, 75% do S4 e 91% do S5 foram menores que 150 mg, enquanto que 41% dos microtubérculos do S1 e 100% do S2 tiveram massa seca entre 151 e 200 mg, apesar da baixa percentagem de sobrevivência das culturas do S2.

Na presença de BAP, de 75% a 100% dos microtubérculos dos somaclones S1, S3, S4 e S5 apresentaram massa seca menor que 100 mg e apenas o S2 apresentou 73% dos microtubérculos com massa seca entre 151 mg e 300 mg. A totalidade dos microtubérculos do somaclone S1 foi menor que 100 mg e não foram formados microtubérculos maiores que 201 mg nos somaclones S1, S3, S4 e S5. Quando o 2iP foi utilizado observa-se, novamente, que apenas o somaclone S2 apresentou 70% dos microtubérculos maiores que 151 mg, onde 40% destes pesaram mais que 201 mg. Os somaclones S1, S3, S4 e S5 apresentaram de 72% a 81% dos microtubérculos menores que 150 mg na presença de 2iP. Apenas uma baixa proporção deles, entre 8% e 27%, tiveram massa seca entre 151 mg e 200 mg e somente em S3 e S4 8% dos microtubérculos foram superiores a 200 mg.

Na Tabela 5 estão representados os resultados de três experimentos independentes, conduzidos para os somaclones S1 e S4, que confirmam os resultados obtidos no experimento anterior, para os tratamentos com ausência ou presença de GA₃ na concentração de 5 µM. Observa-se que, na ausência de reguladores de crescimento, tanto o somaclone S1 quanto o S4, em todos os experimentos conduzidos, apresentaram microtubérculos cuja totalidade não ultrapassou 200 mg de massa seca. Por outro lado, nos experimentos com GA₃, o somaclone S1 apresentou de 21% a 49% de microtubérculos com massa seca superior a 151 mg, com pelo menos 25% destes pesando entre 201 mg e 300 mg. Em todos os experimentos conduzidos para o somaclone S4, 66% dos microtubérculos ultrapassaram 151 mg, e, de 33% a 50% destes pesaram entre 201 mg e 300 mg.

Tabela 5. Distribuição por classes de frequência (%) de massa seca de microtubérculos e número total de microtubérculos formados por tratamento (entre parênteses) pelos somaclones S1 e S4 de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 µM de GA₃. Dados de três experimentos independentes. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006

Tratamentos	Somaclones	Classes de MST (mg)	Experimentos ^a			Média
			1	2	3	
Testemunha	S1	≤ 100	42 (12)	42 (12)	58 (12)	33
		101-150	0	8	42	17
		151-200	58	50	0	36
		201-300	0	0	0	0
		> 300	0	0	0	0
	S4	≤ 100	0	33 (12)	75 (12)	36
		101-150	33 (12)	8	25	22
		151-200	50	58	0	36
		201-300	0	0	0	0
		> 300	0	0	0	0
GA ₃	S1	≤ 100	16 (12)	16 (12)	25 (12)	19
		101-150	33	25	25	28
		151-200	8	16	8	11
		201-300	33	25	33	30
		> 300	8	16	0	8
	S4	≤ 100	16 (12)	16 (12)	16 (12)	16
		101-150	16	16	16	16
		151-200	33	16	33	27
		201-300	33	50	33	39
		> 300	0	0	0	0

^a Valores de proporções calculadas com base no número total de doze microtubérculos formados. MST= massa seca dos microtubérculos.

3.3.3. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento dos bulbilhos aéreos

Na presença de GA_3 , o somaclone S5 apresentou a maior média de massa seca dos bulbilhos aéreos (25 mg), seguido pelos somaclones S4 (20 mg), S1 (16 mg), S2 (3 mg) e S3 (1 mg). Na ausência de reguladores de crescimento, os somaclones S2, S4 e S5 formaram bulbilhos aéreos com massas secas médias de 3 mg, 6 mg e 1 mg, respectivamente. Quando na presença de AIB, o somaclone S1 apresentou bulbilhos aéreos com massa seca de 32 mg e o S2 de 13 mg. Dos demais somaclones, apenas o S5 formou bulbilhos com massa seca de 6 mg. Em meio de cultura contendo ANA, as médias de massa seca dos bulbilhos aéreos foram 2 mg para o somaclone S1, 4 mg para o S2 e 12 mg para o S4 (Figura 1).

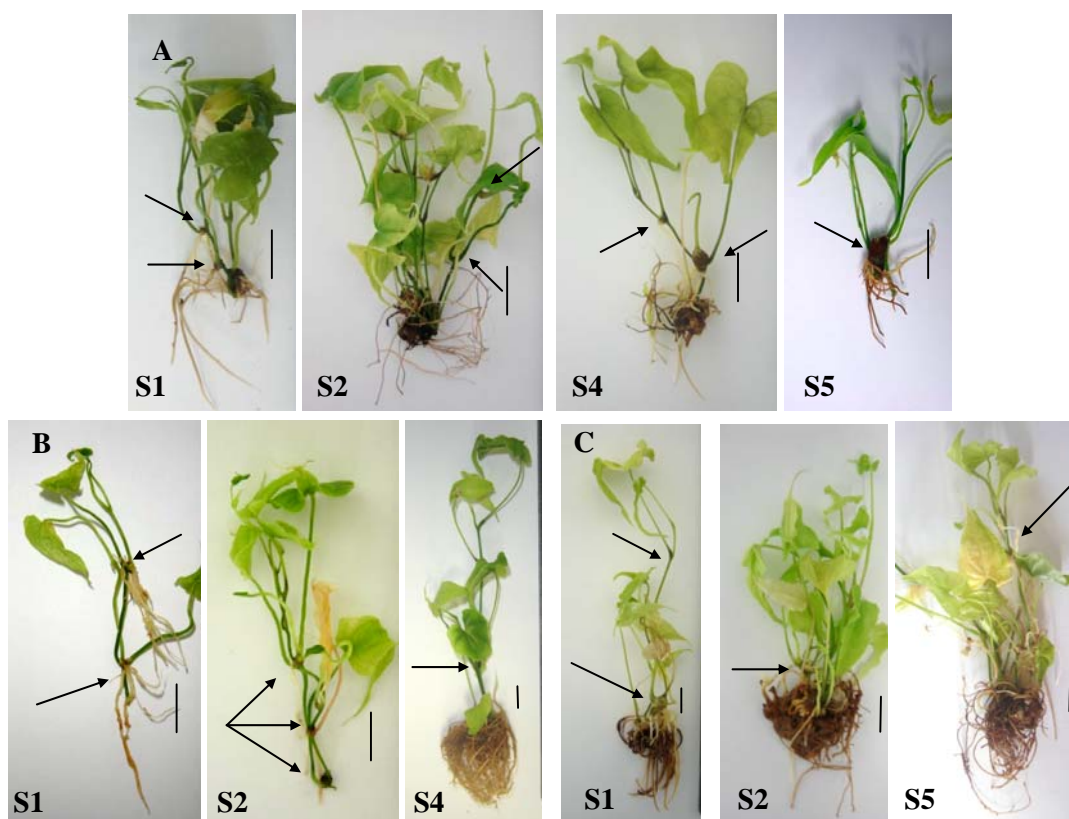


Figura 1. Bulbilhos aéreos (setas) dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos em meio de cultura Murashige & Skoog semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e com 5µM de GA_3 (A), ANA (B) e AIB (C). (barra= 1cm)

3.3.4. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas

Os resultados sobre o crescimento em massa seca da parte aérea e das raízes das plantas dos diferentes somaclones, quando cultivadas na presença ou na ausência de reguladores de crescimento, são mostrados na Tabela 6. Quando se considera a massa seca da parte aérea das plantas observa-se que o GA₃ inibiu o crescimento em relação a testemunha para os somaclones S1, S4 e S5, não tendo efeito sobre o crescimento da parte aérea dos somaclones S2 e S3. Outros reguladores de crescimento que inibiram o incremento em massa seca da parte aérea foram o BAP, para os somaclones S2, S4 e S5 e o 2iP, para os somaclones S2 e S5. Em termos da razão entre a massa seca e a massa fresca da parte aérea verifica-se que os maiores valores, em relação à testemunha, foram observados na presença de GA₃, apenas no caso dos somaclones S1 e S3. O ANA promoveu o maior incremento em massa seca do sistema radicular, em relação à testemunha, em todos os somaclones e no caso dos somaclones S2 e S3, foi tão eficiente quanto ao AIB.

Tabela 6. Efeito de reguladores de crescimento sobre o crescimento em massa seca da parte aérea e do sistema radicular de plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Reguladores de crescimento	Somaclones	MSA (mg) ^a	MSA/MFA ^a	MSR (mg) ^a
GA ₃	S1	82,4 d	0,19 a	26,4 d
ANA		155,9 a	0,15 b	176,3 a
AIB		144,2 ab	0,15 b	107,5 b
BAP		94,2 cd	0,14 b	35,7 d
2iP		107,8 bcd	0,15 b	73,1 c
Testemunha		132,1 abc	0,16 b	31,2 d
GA ₃	S2	80,8 ab	0,16 a	13,2 c
ANA		76,8 abc	0,13 ab	48,8 a
AIB		54,0 abc	0,13 ab	38 ab
BAP		49,1 bc	0,10 b	16,4 cd
2iP		44,8 c	0,15 a	22,0 bcd
Testemunha		98,9 a	0,14 ab	27,6 bc
GA ₃	S3	81,7 bc	0,24 a	14,4 d
ANA		105,8 ab	0,15 cd	100,4 a
AIB		120,4 a	0,15 cd	84,4 ab
BAP		68,8 c	0,13 d	9,0 d
2iP		81,2 bc	0,17 bc	65,9 b
Testemunha		105 abc	0,19 b	35,0 c
GA ₃	S4	74,4 b	0,18 a	20,8 c
ANA		147,1 a	0,18 a	160,1 a
AIB		155,2 a	0,15 ab	75,7 b
BAP		74,0 b	0,12 b	29,2 c
2iP		117,7 a	0,14 b	84,7 b
Testemunha		136,2 a	0,16 ab	30,1 c
GA ₃	S5	64,5 b	0,17 a	22,9 c
ANA		128,7 a	0,13 bc	126,7 a
AIB		159,1 a	0,15 ab	62,1 b
BAP		77,8 b	0,12 c	16,7 c
2iP		62,8 b	0,17 a	32,4 c
Testemunha		125,6 a	0,15 ab	42,8 bc

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MFA= massa fresca da parte aérea; MSA= massa seca da parte aérea; MSR= massa seca das raízes.

Os resultados da Tabela 7 indicam que, para os somaclones S1, S2 e S5, o BAP inibiu a formação de ramos em relação à testemunha. Outros reguladores de crescimento que tiveram ação inibitória semelhante foram o 2iP, para os somaclones S2 e S5, o AIB, para o somaclone S2 e o GA₃, para os somaclones S4 e S5. No caso do somaclone S3 o GA₃ e o ANA promoveram a formação de ramos. Quanto ao crescimento do maior ramo verificou-se que, para os somaclones S1 e S4, nenhum regulador de crescimento apresentou efeito em

relação à testemunha, enquanto que para o S2 o 2iP teve efeito inibitório. Para o somaclone S3 o BAP promoveu o crescimento do ramo, enquanto que para o somaclone S5 o ANA e o AIB apresentaram esse efeito promotor. Entretanto, quando se analisou o número de nós formados por planta observou-se que os tratamentos que causaram inibição em relação à testemunha foram o GA₃ e o BAP para o somaclone S1, o 2iP para o somaclone S2, o GA₃, para o somaclone S4 e todos os tratamentos, com exceção do AIB, para o somaclone S5. Em termos do número total de gemas produzidas por planta verificou-se que os reguladores de crescimento que inibiram a formação de gemas, em relação à testemunha, foram o BAP e o 2iP para os somaclones S2 e S5, o GA₃ para os somaclones S1, S4 e S5, e o AIB para S1 e S5. No caso do somaclone S3, nenhum regulador de crescimento teve efeito sobre número de gemas em relação à testemunha, mas o 2iP e o GA₃ provocaram inibição em relação aos demais reguladores.

Tabela 7. Efeito de reguladores de crescimento sobre o crescimento da parte aérea de plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Reguladores de crescimento	Somaclones	Nº de ramos.planta ^{-1a}	Comprimento do maior ramo (cm) ^a	Nº de nós.planta ^{-1a}	Nº de gemas.planta ^{-1a}
GA ₃	S1	3,2 ab	2,1 a	8,4 b	14,7 c
ANA		3,7 a	3,7 a	13,1 ab	25,2 ab
AIB		3,6 a	3,3 a	11,3 ab	18 bc
BAP		1,9 b	2,0 a	8,3 b	13,0 c
2iP		3,1ab	2,5 a	9,4 ab	21,1 abc
Testemunha		3,7 a	3,0 a	13,7 a	28,2 a
GA ₃	S2	3,6 ab	1,3 a	16,5 ab	31,8 ab
ANA		4,1 ab	0,8 abc	17,5 ab	34,1 ab
AIB		2,5 b	0,9 abc	11,2 abc	21,0 abc
BAP		2,3 b	0,7 bc	10,4 bc	16,3 bc
2iP		1,9 b	0,4 c	5,0 c	8,3 c
Testemunha		5,3 a	1,2 ab	23,1 a	47,4 a
GA ₃	S3	2,4 ab	0,4 abc	5,6 c	12,0 bc
ANA		3,0 a	0,6 ab	12,0 ab	26,3 a
AIB		2,2 abc	0,6 abc	13,7 a	24,0 a
BAP		1,8 bc	0,8 a	14,3 a	23,4 ab
2iP		1,4 c	0,2 c	6,2 bc	11,7 c
Testemunha		1,3 c	0,3 bc	8,6 abc	18,7 abc
GA ₃	S4	2,2 b	1,7 b	6,7 b	13,0 c
ANA		3,2 ab	3,7 a	11,2 ab	20,2 abc
AIB		4,0 ab	3,6 a	14,5 a	24,9 ab
BAP		2,3 ab	2,0 ab	10,8 ab	15,5 bc
2iP		3,0 ab	3,4 a	12,4 a	21,9 abc
Testemunha		4,6 a	3,1 ab	14,6 a	28,2 a
GA ₃	S5	1,7 b	1,6 b	7,0 bc	12,9 bc
ANA		3,2 a	4,6 a	9,8 bc	17,0 bc
AIB		3,2 a	5,0 a	11,3 ab	18,6 b
BAP		1,6 b	1,9 b	8,3 bc	12,0 bc
2iP		1,8 b	1,0 b	5,6 c	10,2 c
Testemunha		3,3 a	2,4 b	15,0 a	30,3 a

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicam que, quando se compara, para cada regulador de crescimento testado as respostas de crescimento em massa seca da parte aérea, observa-se que tanto na presença como na ausência de reguladores de crescimento não houve diferença entre os somaclones. Contudo, na presença de ANA o incremento em massa seca foi inibido para os somaclones S2 e S3 e o AIB apenas inibiu o crescimento do somaclone S2. Na presença de BAP apenas os somaclones S1 e S2 diferiram em termos de massa seca, com

menor valor para o S2. O 2iP apenas promoveu o aumento em massa seca dos somaclones S1 e S4. Em termos dos valores de razão entre massa seca e massa fresca verifica-se que com o GA₃ apenas o somaclone S3 apresentou maior acúmulo de massa seca por unidade de massa fresca, em relação aos demais. O ANA promoveu o aumento da razão entre a massa seca e massa fresca apenas para o somaclone S4, enquanto que as respostas dos somaclones não diferiram na presença de AIB. O BAP diminuiu o valor da razão do somaclone S2 em relação aos somaclones S1 e S3 e o 2iP inibiu o acúmulo de massa seca por unidade de massa fresca apenas no caso do somaclone S4 em relação ao S5. Na ausência de reguladores de crescimento o único somaclone em que a razão foi promovida foi o S3. Quando se analisou o crescimento do sistema radicular observou-se que o GA₃ inibiu o incremento em massa seca do somaclone S2 em relação aos somaclones S5 e S1. O ANA inibiu o incremento do sistema radicular do somaclone S2 em relação aos demais, mas apresentou efeito promotor para os somaclones S1 e S4. Efeito semelhante foi observado com o 2iP, sendo que, neste caso, o efeito promotor ocorreu para os somaclones S1 e S3. O BAP apenas inibiu o acúmulo em massa seca do sistema radicular do somaclone S3 em relação ao S1, enquanto que o 2iP apresentou efeito inibitório apenas no caso dos somaclones S2 e S5 em relação aos demais. Na ausência de reguladores de crescimento os somaclones não apresentaram diferenças quanto à massa seca do sistema radicular.

Tabela 8. Crescimento em massa seca da parte aérea e do sistema radicular de plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Reguladores de crescimento	MSA (mg) ^a	MSA/MFA ^a	MSR (mg) ^a
S1	GA ₃	82,4 a	0,19 ab	26,4 a
S2		80,8 a	0,16 b	13,2 c
S3		81,7 a	0,24 a	14,4 bc
S4		74,4 a	0,18 b	20,8 abc
S5		64,5 a	0,17 b	22,9 ab
S1	ANA	155,9 a	0,15 ab	176,3 a
S2		76,8 c	0,13 b	48,8 c
S3		105,8 bc	0,15 ab	100,4 b
S4		147,1 a	0,18 a	160,1 a
S5		128,7 ab	0,13 b	126,7 b
S1	AIB	144,2 a	0,15 a	107,5 a
S2		54,0 b	0,13 a	38,0 c
S3		120,4 a	0,15 a	84,4 ab
S4		155,2 a	0,15 a	75,7 bc
S5		159,1 a	0,15 a	62,1 bc
S1	BAP	94,2 a	0,14 a	35,7 a
S2		49,1 b	0,10 b	16,4 ab
S3		68,8 ab	0,13 a	9,0 b
S4		74,0 ab	0,12 ab	29,2 ab
S5		77,8 ab	0,12 ab	16,7 ab
S1	2iP	107,8 ab	0,15 ab	73,1 a
S2		44,8 d	0,15 ab	22,0 b
S3		81,2 bc	0,17 ab	65,9 a
S4		117,7 a	0,14 b	84,7 a
S5		62,8 cd	0,17 a	32,4 b
S1	Testemunha	132,1a	0,16 b	31,2 a
S2		98,9 a	0,14 b	27,6 a
S3		105,0 a	0,19 a	35,0 a
S4		136,2 a	0,16 b	30,1 a
S5		125,6 a	0,15 b	42,8 a

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca; MS= massa seca; MSA= massa seca da parte aérea.

Os resultados da Tabela 9 indicam que na presença de ANA e BAP os somaclones não diferiram quanto ao número de ramos produzidos. Contudo, na presença de GA₃ o número de ramos do somaclone S5 foi menor em relação aos somaclones S1 e S2. Na presença de AIB o menor número de ramos por planta foi apresentado pelo somaclone S3, enquanto que com o 2iP os maiores valores foram observados para o S1 e S4. Na ausência de reguladores de

crescimento o somaclone S3 foi o que apresentou o menor número de ramos, não havendo diferença entre os demais.

Tabela 9. Influência dos reguladores de crescimento sobre o crescimento da parte aérea de plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de 5 μ M de GA₃, ANA, AIB, BAP ou 2iP. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Reguladores de crescimento	Nº de ramos.planta ^{-1a}	Comprimento do maior ramo (cm) ^a	Nº de nós.planta ^{-1 a}	Nº de gemas.planta ^{-1 a}
S1	GA ₃	3,2 ab	2,1 a	8,4 b	14,7 b
S2		3,7 a	1,3 ab	16,5 a	31,8 a
S3		2,4 bc	0,4 b	5,6 b	12,0 b
S4		2,2 bc	1,7 a	6,7 b	13,0 b
S5		1,7 c	1,6 ab	7,0 b	12,9 b
S1	ANA	3,7 a	3,7 a	13,1 ab	25,2 ab
S2		4,1 a	0,8 b	17,5 a	34,1 a
S3		3,0 a	0,6 b	12,0 ab	26,3 ab
S4		3,2 a	3,8 a	11,2 ab	20,2 b
S5		3,2 a	4,6 a	9,8 b	17,0 b
S1	AIB	3,6 a	3,3 b	11,3 a	18,0 a
S2		2,5 ab	0,9 c	11,2 a	21,0 a
S3		2,2 b	0,6 c	13,7 a	24,0 a
S4		4,0 a	3,6 b	14,5 a	24,9 a
S5		3,2 ab	5,0 a	11,3 a	18,6 a
S1	BAP	1,9 a	2,0 a	8,3 a	13,0 b
S2		2,3 a	0,7 c	10,4 a	16,3 ab
S3		1,8 a	0,8 bc	14,3 a	23,4 a
S4		2,3 a	2,0 a	10,8 a	15,5 ab
S5		1,6 a	1,9 ab	8,3 a	12,0 b
S1	2iP	3,1 a	2,5 a	9,4 ab	21,1 a
S2		1,9 b	0,4 b	5,0 b	8,3 b
S3		1,4 b	0,2 b	6,2 b	11,7 b
S4		3,0 a	3,4 a	12,4 a	21,9 a
S5		1,8 b	1,0 b	5,6 b	10,2 b
S1	Testemunha	3,7 ab	3,0 a	13,7 b	28,2 b
S2		5,3 a	1,2 bc	23,1 a	47,4 a
S3		1,3 c	0,3 c	8,6 b	18,7 b
S4		4,6 ab	3,1 a	14,6 ab	28,2 b
S5		3,3 b	2,4 ab	15,0 ab	30,3 ab

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quando se analisa o comprimento do maior ramo produzido por planta é possível observar que, na presença de GA₃, o somaclone que apresentou o ramo de menor comprimento foi o S3. Com o ANA, AIB, BAP, 2iP e na ausência de reguladores de

crescimento os somaclones S2 e S3 apresentaram os menores ramos, onde, no caso do 2iP, o mesmo resultado foi observado também para os somaclone S5.

Em termos do número de nós produzidos por planta é possível verificar que, com AIB e BAP, não foram observadas diferenças entre os somaclones, mas na presença do GA₃ o número de nós formados pelo somaclone S2 foi superior aos demais somaclones, da mesma forma que o número de gemas formadas por planta. Com o ANA o número de nós apresentados pelo somaclone S2 foi superior apenas ao do somaclone S5 e na ausência de reguladores de crescimento foi superior apenas aos somaclones S1 e S3. Entretanto, na presença de 2iP, o somaclone S4 apresentou o maior número de nós em relação aos somaclones S2, S3 e S5. O número de gemas produzidas por planta não foi alterado para nenhum dos somaclones na presença de AIB, enquanto que com o GA₃ e na ausência de reguladores de crescimento o somaclone S2 apresentou o maior número de gemas em comparação com os demais. Já na presença de ANA, o somaclone S2 foi superior apenas aos somaclones S4 e S5. Com o BAP o somaclone S3 foi superior aos somaclones S1 e S5 e com o 2iP os somaclones S1 e S4 foram superiores aos demais. O BAP induziu o desenvolvimento anormal da parte aérea dos somaclones, originando caules atrofiados com tamanho de folhas bastante reduzido (Figura 2).

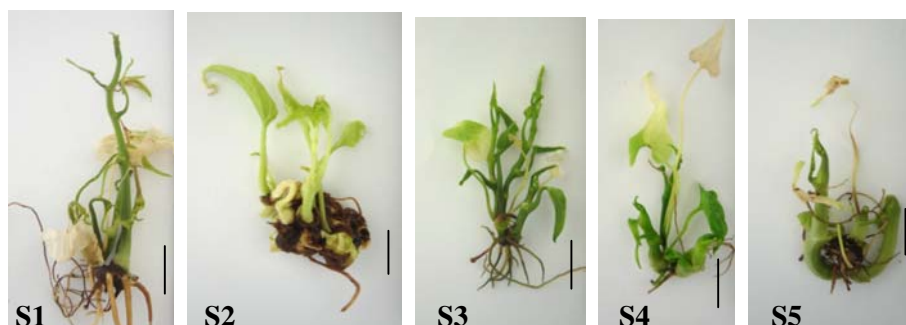


Figura 2. Desenvolvimento anormal das plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e de 5 μ M BAP. (barra =1cm)

3.4. DISCUSSÃO

A utilização de reguladores de crescimento para potencializar a indução de microtubérculos, tem sido relatada na literatura para diversas espécies do gênero *Dioscorea* (Sengupta *et al.*, 1984; Ng, 1988; Mantell & Hugo, 1989; John *et al.*, 1993; Kohmura *et al.*, 1995; Alizadeh *et al.*, 1998; Chu, 1998), embora a atuação desses reguladores não siga uma regra geral (Chu, 1998).

Na ausência de reguladores de crescimento, as plantas dos diferentes somaclones de *D. composita* produziram microtubérculos, mas, os reguladores de crescimento incrementaram esta indução, na maioria das vezes. Alizadeh *et al.* (1998), citam que em um grande número de espécies de *Dioscorea* cultivadas *in vitro*, os reguladores de crescimento da classe das auxinas e das citocininas são efetivos na indução de microtubérculos, embora certos tipos de reguladores sejam mais eficientes do que outros. Esses autores citam, porém, que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura também pode inibir o processo de indução e crescimento dos microtubérculos, conforme ocorrido com as plantas dos diferentes somaclones de *D. composita* quando na presença de BAP. Efeito semelhante foi relatado por John *et al.* (1993), que constataram que a percentagem de tuberização em plantas de *D. alata* foi menor na presença BAP (2,5 μ M). Estes autores obtiveram percentagem média de apenas 3% das plantas com microtubérculos. Alizadeh *et al.* (1998), também observaram menor capacidade de indução e crescimento de microtubérculos em plantas de *D. composita* quando inoculadas em meio de cultura suplementado com BAP (5,0 μ M), alcançando percentagem média de 47% de plantas com microtubérculos. Esses resultados são inferiores aos obtidos no presente trabalho.

O BAP foi o único regulador de crescimento que não estimulou a indução dos microtubérculos das plantas de qualquer dos 5 somaclones quando comparado com as plantas inoculadas em meio sem reguladores. Contudo, estudos sobre a microtuberização de *D. rotundata* (Ng, 1988), *D. alata* e *D. bulbifera* (Mantell & Hugo, 1989) citam que as citocininas têm papel importante no processo de tuberização. Além disso, Figueiredo-Ribeiro *et al.* (2004), mencionam um possível envolvimento das citocininas na indução de tubérculos através das divisões celulares, uma das primeiras alterações morfológicas do processo de tuberização.

Estudos sobre a tuberização sugerem haver um controle hormonal endógeno deste processo. As giberelinas, dentre os hormônios vegetais, estão relacionadas com o controle da tuberização, sendo muitas vezes consideradas inibidoras da tuberização por apresentarem respostas análogas aos efeitos ambientais não indutivos (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 2004). O efeito inibitório das giberelinas, pelo contrário, não foi confirmado neste estudo para *D. composita*.

Para os diferentes somaclones de *D. composita*, as auxinas desencadearam uma melhor indução de tuberização, ao contrário do referido na literatura. Estes resultados podem ser devido ao grande número de genes que participam do controle da tuberização, os quais desencadeiam mudanças nas concentrações de vários compostos controladores deste processo. Assim, de acordo com Figueiredo-Ribeiro *et al.* (2004), apenas métodos analíticos podem avaliar se as proteínas associadas aos genes controladores da tuberização correspondem a um único composto ou a uma série de compostos que atuam convergentemente.

Bulbilhos aéreos também foram formados em *D. floribunda* (Sengupta *et al.*, 1984) na presença de ANA ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), desenvolvendo raízes e parte aérea dentro de 20 dias, alcançando sobrevivência de 100% quando transferidos para o solo. Estas estruturas aéreas

podem ser mais uma fonte para a propagação vegetativa da espécie, juntamente com os tubérculos.

É possível que as diferenças entre os resultados de indução e desenvolvimento de microtubérculos deste trabalho e os apresentados na literatura sejam devidas a diferenças entre os materiais vegetais estudados (John *et al.*, 1993; Ng, 1988), ao meio de cultura e aos reguladores de crescimento utilizados. Além disso, uma possível variação entre os somaclones pode ter acarretado as diferenças encontradas para as plantas de *D. composita*.

Uma das principais funções das citocininas é promover a divisão celular e, com isso, favorecer o crescimento de gemas laterais, a expansão foliar e a morfogênese (Davies, 1995). Entretanto, para as plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*, não foi observado um aumento no potencial de indução de ramos, ou no número de gemas e de nós, em presença de citocininas. Resultado semelhante foi observado em plantas de *D. alata* (Borges *et al.*, 2004), em que não ocorreu incremento no número de nós quando o meio de cultura foi suplementado com 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, indicando não ser importante para a regeneração e multiplicação da espécie. Contudo, o número de nós das plantas dos diferentes somaclones neste experimento foi maior que os encontrados por Alizadeh *et al.* (1998), quando plantas de *D. composita* foram inoculadas em meio contendo 5 µM de BAP e 2iP. Estes autores também detectaram o desenvolvimento anormal das plantas quando inoculadas em meio contendo citocininas.

Os resultados obtidos no presente trabalho, para adição de citocininas ao meio de cultura, podem ser devidos ao local de síntese destas substâncias, que são sintetizadas especialmente nos meristemas dos ápices das raízes e transportadas para a parte aérea, através dos vasos condutores, juntamente com a água e os nutrientes absorvidos pelas raízes. Como pode ser observado, para *D. composita*, houve uma correlação entre a menor massa seca das raízes e a menor massa seca da parte aérea. Esta correlação mostrou-se evidente quando os

somaclones foram cultivados na presença de citocininas, especialmente o BAP. Isto sugere que a adição de citocininas ao meio de cultura não foi eficiente para a promoção do crescimento da parte aérea das plantas, nem para a quebra da dominância apical. Possivelmente, fatores que regulam os níveis de citocinina (enzima citocinina oxidase, citocinina conjugada) podem estar inativando irreversivelmente as citocininas, limitando os efeitos deste regulador (Taiz & Zeiger, 2004). Além disso, o sítio de ligação para este regulador pode estar já ocupado, tornando-se desnecessário o aporte de citocininas ao meio de cultura. De acordo com Taiz & Zeiger (2004), a aplicação de citocininas inibe o processo de alongamento de caules e raízes, e as concentrações fisiológicas normais de citocininas endógenas podem inibir o crescimento das raízes, explicando, assim, o pequeno desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular dos somaclones na presença destes reguladores.

As auxinas afetam muitos processos do desenvolvimento do vegetal, especialmente o alongamento celular, a dominância apical, o crescimento inicial das raízes e o fototropismo (Davies, 1995; Arteca, 1996; Taiz & Zeiger, 2004). Esta característica de crescimento radicular foi observada nas plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*, que apresentaram maior massa seca das raízes quando inoculadas em meio contendo auxinas, especialmente na presença de ANA. A ação de AIB sobre a sobrevivência do somaclone S2 pode ser resultado da alta concentração (5 μM) utilizada no meio de cultura, causando toxicidade, uma vez que a concentração ótima de auxina está tipicamente entre 10^{-6} e 10^{-5} M (Taiz & Zeiger, 2004). Os resultados relacionados ao número de nós foram maiores do que os obtidos por Alizadeh *et al.* (1998) para a mesma espécie. Na presença de 5 μM de ANA e AIB, os autores obtiveram média máxima de 7 nós por planta, ao contrário do resultado obtido no presente trabalho onde o maior número médio foi 17,5 nós por planta. A ausência de diferenças entre os somaclones e a testemunha, com exceção do somaclone S2, para a

variável de número de ramos, na presença de auxinas, sugere que o efeito de dominância apical não é mais intensificado quando há a suplementação do meio de cultura com auxinas. Subentende-se então, que a presença conjunta destes reguladores, e não isolada, no meio de cultura poderia potencializar o crescimento das plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*.

Isoladas primeiramente de um fungo (*Gibberella fujikuroi*), que deu origem ao nome deste regulador de crescimento, as giberelinas influenciam o alongamento do caule, controlam vários aspectos da germinação da semente e também a indução da floração (Davies, 1995; Arteca, 1996; Taiz & Zeiger, 2004). Com relação ao alongamento dos entrenós de muitas espécies, esta característica é mais evidenciada em plantas anãs ou rosetas (Taiz & Zeiger, 2004), especialmente quando há giberelina exógena, que provoca aumento no caule semelhante às variedades mais altas da espécie. Este estímulo, mais pronunciado em plantas anãs e rosetas, fundamenta os resultados obtidos com relação a variável de comprimento do maior ramo, para as plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*, que foram iguais a testemunha, provavelmente porque apresentavam padrão normal de crescimento antes da inoculação em meio contendo GA₃. Além disso, as giberelinas regulam seu próprio metabolismo, inibindo a transcrição de genes codificadores das enzimas responsáveis pela sua biossíntese ou degradação. A aplicação de giberelinas provoca a diminuição da expressão dos genes da biossíntese e aumento na transcrição de genes de degradação (Taiz & Zeiger, 2004).

A atuação dos reguladores de crescimento sobre o desenvolvimento das plantas, indução e desenvolvimento dos microtubérculos dos diferentes somaclones de *D. composita* não segue uma regra geral. Entretanto, pode-se inferir que essas características são resultantes da combinação de vários fatores, especialmente da atuação conjunta dos reguladores de crescimento, uma vez que um regulador pode influenciar a biossíntese de outro, de modo que os efeitos produzidos por um podem ser mediados por outro. Por isso, a verificação da

influência dos reguladores de crescimento, quando adicionados concomitantemente ao meio de cultura, foi posteriormente estudada.

3.5. CONCLUSÕES

1. As respostas de morfogênese, concernentes à formação de ramos e raízes, não variam entre os somaclones, na ausência ou presença de reguladores de crescimento, mas a percentagem de tuberização, senescência e formação de bulbilhos aéreos variam entre os somaclones e para um mesmo somaclone variam com o tipo de regulador de crescimento.

2. Os microtubérculos são induzidos também na ausência de reguladores de crescimento, porém a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura incrementa, na maioria das vezes, essa indução.

3. Bulbilhos aéreos são produzidos na presença de GA_3 , ANA e/ou AIB pelos somaclones S1, S2, S3, S4 e S5 e na ausência de reguladores de crescimento pelos somaclones S2, S4 e S5.

4. Cada somaclone requer diferentes reguladores de crescimento para que sejam produzidos microtubérculos com maior massa seca. Recomendam-se os seguintes reguladores de crescimento: GA_3 e ANA (para o somaclone S1); ANA (para o S2); ANA, AIB ou 2iP (para o S3); ANA e AIB (para o S4) e GA_3 (para o S5).

5. Os melhores somaclones para a produção de microtubérculos com maior massa seca são: na presença de GA₃ (todos exceto o S3); de ANA (o S2); de AIB (todos exceto o S3 e o S5); de 2iP (o S2); na ausência de reguladores (o S2).

6. Microtubérculos não têm maior indução, na presença de BAP, para nenhum dos somaclones quando comparado com as plantas inoculadas em meio sem reguladores de crescimento.

7. Ao contrário do referido na literatura, as auxinas desencadeiam melhor indução de tuberização nos somaclones.

8. Para produzir o maior número de segmentos nodais para a multiplicação vegetativa não se recomenda os seguintes reguladores de crescimento: GA₃ e BAP (para o somaclone S1); o 2iP (para o S2); o GA₃ e 2iP (para o S3); o GA₃ (para o S4) e GA₃, BAP e 2iP (para o S5).

9. Os somaclones que garantem a melhor produção de segmentos nodais para a multiplicação vegetativa são: na presença de GA₃ (o somaclone S2); de ANA (o S2); de AIB e de BAP (todos os somaclones); de 2iP (o S4) e na ausência de reguladores de crescimento (o S2).

10. As diferentes respostas de crescimento dos somaclones, na ausência e na presença de reguladores de crescimento, indicam a existência de variação somaclonal.

CAPÍTULO 4

EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO, ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E GLUTAMINA SOBRE A MORFOGÊNESE E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE SOMACLONES DE *D. composita* Hemsl.

4.1. INTRODUÇÃO

O crescimento vegetal é consequência da interação de muitos processos tais como a fotossíntese, o transporte a longa distância, a respiração, as relações hídricas e a nutrição mineral (Lambers *et al.*, 1998). Estes processos são responsáveis pelo incremento em massa seca dos órgãos vegetais bem como do número ou do tamanho das células, envolvendo principalmente divisão, expansão e diferenciação. O crescimento dos tecidos não é nem uniforme nem aleatório, podendo o crescimento total das plantas ser considerado como a soma de padrões locais de crescimento (Taiz & Zeiger, 2004). Sendo assim, o crescimento em plantas é definido como um aumento irreversível de volume.

Muitos aspectos de crescimento e desenvolvimento dos vegetais são controlados pelos reguladores de crescimento, os quais afetam de forma positiva e negativa os padrões de crescimento (Lambers *et al.*, 1998). Giberelinas e auxinas são duas classes de reguladores de crescimento importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal, especialmente no que diz respeito ao crescimento da parte aérea e do sistema radicular.

O nitrogênio é de importância indiscutível em qualquer fase do desenvolvimento vegetal, especialmente porque é responsável pela formação de compostos vitais, tais como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Pode ser fornecido ao vegetal na forma inorgânica ou orgânica. Quando fornecido na forma inorgânica, é imediatamente transformado em glutamina, sendo esta molécula doadora de nitrogênio para uma série de reações biossintéticas (Cánovas *et al.*, 1998; Leningher, 2000). Da amida glutamina o nitrogênio é transferido para a maioria dos compostos nitrogenados presentes nos vegetais, tais como os aminoácidos, nucleotídeos, as clorofilas, as poliaminas e os alcalóides. Assume, também, um papel essencial na biossíntese de hormônios vegetais, tais como as auxinas, citocininas e o etileno, pois estas classes hormonais possuem, como precursores aminoácidos ou moléculas contendo átomos de nitrogênio na formulação química. Desta forma, o metabolismo do nitrogênio e a disponibilidade deste mineral interfere diretamente na biossíntese hormonal (Taiz & Zeiger, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃), aplicado isoladamente ou em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) ou glutamina sobre o crescimento *in vitro* de plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Origem do material vegetal e manutenção dos estoques dos diferentes somaclones de *D. composita*

Foram utilizadas plantas de *Dioscorea composita* regeneradas de um único calo e multiplicadas conforme metodologia já descrita no item 3.2.1. do capítulo 3. As condições de manutenção dos diferentes somaclones em sala de crescimento também estão descritas no item referido anteriormente.

4.2.2. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

Plantas inteiras dos somaclones S1, S2, S3, S4 e S5 com idades entre 95 e 99 dias, cultivadas nas condições descritas no item 4.2.1., foram utilizadas. As plantas foram inoculadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS suplementado com 8% de sacarose e 0,2% de Phytigel e com concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 μ M de GA₃. O meio de cultura testemunha não continha reguladores de crescimento.

Após 4 meses, as culturas foram avaliadas quanto à percentagem de formação de ramos, de raízes, de microtubérculos e de bulbilhos aéreos. O crescimento das culturas foi avaliado através da determinação da massa seca da parte aérea, das raízes e dos microtubérculos, número de nós, de gemas e de folhas. A partir destes dados foram calculados os teores de água dos microtubérculos, assim como os valores da razão massa seca/massa fresca da parte aérea, dos microtubérculos e da razão massa seca do tubérculo/massa seca da parte aérea. Foram utilizadas 12 repetições de cada somaclone por tratamento.

4.2.3. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

Foram utilizadas plantas dos somaclones S1 e S4 com idade de 126 dias, cultivadas nas condições descritas no item 4.2.1. As plantas foram inoculadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS suplementado com 8% de sacarose e 0,2% de Phytigel e com 5,0 μ M de GA₃. Após períodos de 15, 30 e 45 dias as plantas foram transferidas para meio de cultura contendo os mesmos constituintes acima mencionados, mas sem a presença de GA₃. Foram também conduzidos os tratamentos em que as plantas foram mantidas, durante todo o período do experimento, em meio de cultura descrito acima, sem GA₃ e em meio de cultura com GA₃.

Após 4 meses, as culturas foram avaliadas quanto à percentagem de formação de ramos, de raízes, de microtubérculos e de bulbilhos aéreos. O crescimento das culturas foi avaliado através da determinação da massa seca da parte aérea, das raízes e dos microtubérculos, número de nós, de gemas e de folhas. A partir destes dados, o teor de água dos microtubérculos, os valores da razão massa seca/massa fresca da parte aérea, dos microtubérculos e a razão massa seca do tubérculo/massa seca da parte aérea foram calculados. Foram utilizadas 12 repetições de cada somaclone por tratamento.

4.2.4. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

Foram utilizadas plantas dos somaclones S1 e S4 com idade entre 124 e 173 dias, cultivadas nas condições descritas no item 4.2.1. As plantas foram inoculadas em tubos de

ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS suplementado com 8% de sacarose e 0,2% de Phytigel, 5,0 μ M de GA₃ e concentrações de 2,5 μ M e 5,0 μ M de ANA. Ao meio de cultura do controle não foi adicionado o ANA. Após 4 meses, as culturas foram avaliadas quanto à percentagem de formação de ramos, de raízes, de microtubérculos e de bulbilhos aéreos. O crescimento das culturas foi avaliado através da determinação da massa seca da parte aérea, das raízes e dos microtubérculos, número de nós, de gemas e de folhas. A partir destes dados foram calculados o teor de água dos microtubérculos, os valores da razão massa seca/massa fresca da parte aérea, dos microtubérculos e a razão massa seca do tubérculo/massa seca da parte aérea. Foram utilizadas 12 repetições de cada somaclone por tratamento.

4.2.5. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

Foram utilizadas plantas dos somaclones S1 e S4 com idade de 124 dias, cultivadas nas condições descritas no item 4.2.1. As plantas foram inoculadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS suplementado com 8% de sacarose e 0,2% de Phytigel, 5,0 μ M de GA₃ e concentrações de 2,73 mM e 4,10 mM de glutamina. Ao meio de cultura da testemunha não foi adicionada glutamina. As culturas foram avaliadas, após 4 meses quanto à percentagem de formação de ramos, de raízes, de microtubérculos e de bulbilhos aéreos. O crescimento das culturas foi avaliado através da determinação da massa seca da parte aérea, das raízes, e dos microtubérculos, número de nós, de gemas e de folhas. A partir destes dados foram calculados o teor de água dos microtubérculos, os valores da razão massa seca/massa fresca da parte aérea, dos microtubérculos e da razão massa seca do

tubérculo/massa seca da parte aérea. Foram utilizadas 12 repetições de cada somaclone por tratamento.

4.2.6. Determinação da massa seca das plantas

Após a determinação da massa fresca foi determinada a massa seca das plantas produzidas em cada tratamento conforme a metodologia descrita no item 3.2.3. do capítulo 3.

4.2.7. Análise estatística

Em todos os experimentos foi utilizado o delineamento completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student, ao nível de 5% de probabilidade, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos, ou de análise de variância simples ou multifatorial, com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, quando mais de dois tratamentos foram comparados (Gomez & Gomez, 1984). Quando pertinente os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada da porcentagem antes da realização da análise estatística.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

4.3.1.1. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre a morfogênese das plantas

Ramos, raízes e microtubérculos foram induzidos em todas as plantas submetidas aos vários tratamentos (Tabela 1). As plantas de todos os somaclones, exceto o S4, apresentaram maior percentagem de senescência na presença do regulador de crescimento, variando de 16,7% para o somaclone S3 a 41,7% para o somaclone S2, na presença de 7,5 μM de GA_3 . O somaclone que apresentou a maior percentagem de senescência, em todos os tratamentos, inclusive na ausência do GA_3 , foi o S2.

A presença de GA_3 foi fundamental para a indução de bulbilhos aéreos em todos os somaclones exceto o S3, que não apresentou formação de bulbilhos aéreos em nenhum tratamento. Entretanto, a indução de bulbilhos aéreos ocorreu em diferentes concentrações de GA_3 , visto que em todas as concentrações, pelo menos dois somaclones formaram bulbilhos aéreos. Em termos de massa seca dos bulbilhos aéreos, as maiores médias foram observadas para as plantas do somaclone S4, na presença de 5 μM e 7,5 μM de GA_3 (78 mg e 35 mg, respectivamente). As plantas do somaclone S1 apresentaram valores de massas secas de 19 mg e 7 mg, na presença de 2,5 μM e 7,5 μM de GA_3 , respectivamente. Os bulbilhos aéreos das plantas do somaclone S2 tiveram massas secas médias de 8,3 mg e 16 mg, quando na presença de 2,5 μM e 5 μM de GA_3 , respectivamente. Já para as plantas do somaclone S5, que produziram bulbilhos aéreos apenas na presença de 7,5 μM de GA_3 , o valor de massa seca dos mesmos foi de 19 mg.

Tabela 1. Influência de diferentes concentrações de GA₃ sobre a morfogênese e senescência de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	GA ₃ (μM)	Ramos ^a (%)	Raízes ^a (%)	Microtubérculos ^a (%)	Bulbilhos Aéreos ^a (%)	Senescência ^a (%)
S1	0	100	100	100	0	0
	2,5	100	100	100	8,3	0
	5,0	100	100	100	0	0
	7,5	100	100	100	8,3	33,3
S2	0	100	100	100	0	8,3
	2,5	100	100	100	25	16,7
	5,0	100	100	100	25	33,3
	7,5	100	100	100	0	41,7
S3	0	100	100	100	0	0
	2,5	100	100	100	0	8,3
	5,0	100	100	100	0	8,3
	7,5	100	100	100	0	16,7
S4	0	100	100	100	0	0
	2,5	100	100	100	0	8,3
	5,0	100	100	100	8,3	0
	7,5	100	100	100	8,3	0
S5	0	100	100	100	0	9,1
	2,5	100	100	100	0	0
	5,0	100	100	100	0	8,3
	7,5	100	100	100	16,7	25

^a Valores são proporções calculadas com base em doze repetições por tratamento.

4.3.1.2. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre o crescimento dos microtubérculos

Os resultados da Tabela 2 indicam, para cada somaclone, os efeitos das diferentes concentrações de GA₃ sobre o crescimento dos microtubérculos. Para todos os somaclones, as diferentes concentrações testadas não contribuíram para o aumento da massa seca dos microtubérculos em relação a testemunha. Observa-se que, para todos os somaclones, exceto o S2, não houve diferença entre os tratamentos com relação aos valores da razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculos e, conseqüentemente, para os teores de água dos mesmos. Entretanto, para as plantas do somaclone S2, a adição de 7,5 μM de GA₃ promoveu

o acúmulo de massa seca do microtubérculo por unidade de massa fresca, o que, por conseguinte, provocou a diminuição significativa no teor de água em relação ao tratamento sem GA₃. As demais concentrações provocaram respostas semelhantes a testemunha.

Com relação aos valores de razão entre massa seca do microtubérculo e massa seca da parte aérea, diferenças entre os tratamentos foram observadas para todos os somaclones, com exceção do S2. Assim, para o somaclone S1, os maiores valores foram observados na presença de 5,0 e 7,5 µM de GA₃ e diferiram da testemunha. Esta mesma resposta ocorreu nas plantas dos somaclones S3, S4 e S5. Todavia, para o somaclone S5 apenas o GA₃ na concentração de 7,5 µM teve efeito promotor.

Tabela 2. Influência de diferentes concentrações de GA₃ sobre o crescimento e teor de água de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	GA ₃ (µM)	MST (mg) ^a	MST/MFT ^a	MST/MSA ^a	Teor de água (% MFT) ^a
S1	0	130,6 a	0,26 a	0,8 b	73,5 a
	2,5	186,2 a	0,27 a	1,9 ab	72,5 a
	5,0	162,3 a	0,26 a	2,4 a	73,4 a
	7,5	192,9 a	0,27 a	2,6 a	73,4 a
S2	0	209,4 a	0,20 b	3,1 a	79,9 a
	2,5	174,8 a	0,24 ab	1,9 a	76,0 ab
	5,0	193,5 a	0,24 ab	3,1 a	76,4 ab
	7,5*	153,9 a	0,26 a	5,2 a	73,5 b
S3	0	134,6 a	0,25 a	1,0 b	74,7 a
	2,5	120,4 a	0,25 a	1,5 ab	74,7 a
	5,0	161,5 a	0,27 a	2,2 a	73,2 a
	7,5	103,0 a	0,27 a	1,6 ab	73,1 a
S4	0	132,7 a	0,26 a	0,8 b	74,3 a
	2,5	164,5 a	0,27 a	1,4 b	72,9 a
	5,0	174,1 a	0,28 a	2,4 a	71,5 a
	7,5	192,9 a	0,27 a	2,6 a	73,4 a
S5	0	127,3 a	0,27 a	0,7 b	73,1 a
	2,5	136,4 a	0,27 a	1,3 b	73,1 a
	5,0	154,4 a	0,28 a	1,6 b	71,9 a
	7,5	202,9 a	0,27 a	2,8 a	73,3 a

^a Médias de pelo menos 7 repetições (*) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05). MST= massa seca do microtubérculo; MFT= massa fresca do microtubérculo; MSA= massa seca da parte aérea.

Apesar das diferentes concentrações de GA₃ não terem provocado diferenças nas massas secas dos microtubérculos, em relação a testemunha, provocaram diferenças quanto à distribuição das classes de massa seca dos mesmos, como pode ser observado na Tabela 3. Verifica-se que, para os somaclones S1 e S4, as maiores proporções de microtubérculos menores que 100 mg de massa seca ocorreram na ausência de GA₃. Para o somaclone S1 é possível observar que houve tendência, na presença de GA₃, de aumento da percentagem de culturas que apresentaram microtubérculos maiores que 201 mg em relação ao tratamento sem este regulador de crescimento. As percentagens foram de 41%, 33% e 52% para os tratamentos com 2,5 µM, 5,0 µM e 7,5 µM de GA₃, respectivamente. Também para o somaclone S4, nestas mesmas concentrações de GA₃, as percentagens de culturas que formaram microtubérculos maiores que 201 mg foram de 18%, 33% e 50%, respectivamente, não tendo sido observada a formação de microtubérculos, nesta classe de massa seca, na ausência do regulador.

Observa-se, para o somaclone S2, que na ausência de GA₃, 54% dos microtubérculos foram maiores que 201 mg e apenas 9% das culturas apresentaram valores menores que 100 mg. Nas concentrações de 2,5 µM e 5,0 µM de GA₃, as percentagens de plantas que formaram microtubérculos nesta classe de massa seca foram, respectivamente, de 30% e 51%, sendo que na concentração de 7,5 µM de GA₃ não foi observada a formação de microtubérculos maiores que 201 mg de massa seca. Outra resposta importante foi que, tanto na concentração de 2,5 µM quanto na concentração de 5,0 µM de GA₃, não foi formado microtubérculo menor que 100 mg. Na ausência de GA₃, foi verificada, para o somaclone S5, que 56% dos microtubérculos tiveram massa seca superior a 201 mg e, nos demais tratamentos, estas percentagens variaram entre 10% e 27%. As percentagens de microtubérculos menores que 100 mg tenderam a aumentar em relação a testemunha, para 50%, 36% e 27%, respectivamente nas concentrações de 2,5 µM, 5,0 µM e 7,5 µM de GA₃.

Para o somaclone S3 não foram formados microtubérculos maiores que 201 mg de massa seca, na ausência de GA₃. O valor máximo obtido de microtubérculos com massas secas maiores que 201 mg foi 36%, na concentração de 5,0 µM de GA₃. Entretanto, na ausência ou na presença deste regulador, as percentagens de microtubérculos menores que 150 mg variaram entre 54% com 5,0 µM de GA₃ e 80% com 7,5 µM de GA₃.

Tabela 3. Distribuição por frequência (%) de intervalos de classes de massa seca de microtubérculos e número total de microtubérculos formados por tratamento (valores entre parênteses) por diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência ou presença de diferentes concentrações de GA₃. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GA ₃ (µM)	Classes de MST (mg)	Somaclones ^a				
		S1	S2	S3	S4	S5
0	≤ 100	42 (12)	9 (11)	17 (12)	33 (12)	11 (9)
	101-150	25	18	50	17	22
	151-200	33	18	33	50	11
	201-300	0	45	0	0	56
	> 300	0	9	0	0	0
2,5	≤ 100	25 (12)	0 (10)	25 (12)	9 (11)	50 (10)
	101-150	0	30	50	36	10
	151-200	25	40	8	45	30
	201-300	33	30	8	18	10
	> 300	8	0	0	0	0
5,0	≤ 100	25 (12)	0 (8)	18 (11)	17 (12)	36 (11)
	101-150	33	38	36	17	9
	151-200	8	13	8	33	36
	201-300	25	38	36	33	18
	> 300	8	13	0	0	0
7,5	≤ 100	38 (8)	14 (7)	50 (10)	0 (12)	27 (11)
	101-150	13	0	30	25	18
	151-200	0	86	10	33	27
	201-300	26	0	10	50	27
	> 300	26	0	0	0	0

^a Valores são proporções calculadas com base no número total de microtubérculos formados de pelo menos sete repetições por tratamento. MST= massa seca dos microtubérculos.

4.3.1.3. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas

Os resultados sobre o crescimento da parte aérea e das raízes das plantas dos diferentes somaclones, quando cultivadas nos meios contendo diferentes concentrações de GA₃, são mostrados na Tabela 4. Verifica-se que, para o somaclone S2 não houve diferença entre os tratamentos com relação à massa seca da parte aérea, os números de folhas, de nós, de gemas e de ramos produzidos por planta. Para todos os demais somaclones, a presença do regulador de crescimento, nas diferentes concentrações, não promoveu o crescimento em relação a testemunha, quando se analisa as variáveis consideradas anteriormente, apresentando, em vários casos, efeito inibitório. O mesmo tipo de resposta foi obtido para todos os somaclones, com relação aos valores de massa seca das raízes. Apenas os somaclones S1, S2 e S3 (Figura 1A, 1B e 1C) apresentaram valores de razão entre as massas seca e fresca da parte aérea diferentes da testemunha. Para S1, o efeito promotor do GA₃, em relação a testemunha, ocorreu com a presença de 5,0 µM, para o S2 com 7,5 µM e para o S3 com 5,0 µM e 7,5 µM. O comprimento do maior ramo não foi afetado, pela presença do GA₃, apenas para S4 (Figura 1D) e S5 (Figura 1E). Para os demais somaclones, a presença deste regulador de crescimento não apresentou efeito promotor, chegando mesmo a inibir o crescimento, em alguns casos.

Tabela 4. Influência de diferentes concentrações de GA₃ sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	GA ₃ (μM)	MSA (mg) ^a	MSA/ MFA ^a	MSR (mg) ^a	Nº de folhas ^a	Nº de nós ^a	Nº de gemas ^a	Nº de ramos ^a	Compr. do > ramo (cm) ^a
S1	0	161,2 a	0,14 b	76,7 a	18,8 a	18,6 a	29,6 a	4,9 a	3,9 a
	2,5	100,0 b	0,16 ab	57,3 ab	12,8 b	10,3 b	17,5 b	2,7 b	2,5 ab
	5,0	83,6 b	0,18 a	41,3 b	10,0 b	8,8 b	14,6 b	2,3 b	2,5 ab
	7,5	75,4 b	0,17 ab	45,3 ab	11,3 b	8,5 b	15,2 b	2,3 b	1,8 b
S2	0	93,3 a	0,12 b	32,3 a	27,5 a	20,7 a	34,6 a	5,1 a	0,9 b
	2,5	95,6 a	0,13 ab	23,5 ab	26,6 a	21,9 a	5,9 a	4,7 a	1,6 a
	5,0	88,5 a	0,14 ab	28,1 a	30,6 a	25,3 a	43,4 a	4,1 a	1,1 ab
	7,5*	58,8 a	0,16 a	13,1 b	17,0 a	15,3 a	27,1 a	2,7 a	1,0 ab
S3	0	142,6 a	0,14 b	48,8 a	24,3 a	20,5 a	34,8 a	2,9 a	0,9 a
	2,5	85,0 b	0,15 ab	43,6 ab	14,4 b	13,5 b	22,7 b	2,3 ab	0,5 ab
	5,0	78,2 b	0,17 a	39,6 ab	14,6 b	11,5 b	19,8 b	1,8 ab	0,5 ab
	7,5	68,9 b	0,17 a	25,0 b	11,4 b	7,1 b	12,3 b	1,3 b	0,4 b
S4	0	171,7 a	0,15 a	77,6 a	21,5 a	19,6 a	29,4 a	4,8 a	3,9 a
	2,5	120,5 b	0,17 a	54,6 ab	14,9 b	13,7 b	22,5 b	3,5 b	3,8 a
	5,0	77,6 c	0,16 a	41,4 b	10,5 bc	9,6 bc	15,1 c	2,3 c	2,4 a
	7,5	75,1 c	0,16 a	41,3 b	9,2 c	7,7 c	12,9 c	1,9 c	3,0 a
S5	0	181,6 a	0,17 a	52,3 a	17,8 a	16,3 a	24,5 a	4,1 a	4,0 a
	2,5	111,7 b	0,17 a	31,9 b	14,3 ab	11,6 b	19,4 ab	2,8 ab	3,2 a
	5,0	100,3 b	0,17 a	26,7 b	12,9 bc	9,5 bc	14,5 bc	2,7 ab	3,1 a
	7,5	80,6 b	0,17 a	39,1 ab	9,2 c	6,4 c	11,2 c	1,9 b	2,4 a

^a Médias de pelo menos 7 repetições (*) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05). MSA= massa seca da parte aérea; MFA= massa fresca da parte aérea; MSR= massa seca da raiz.

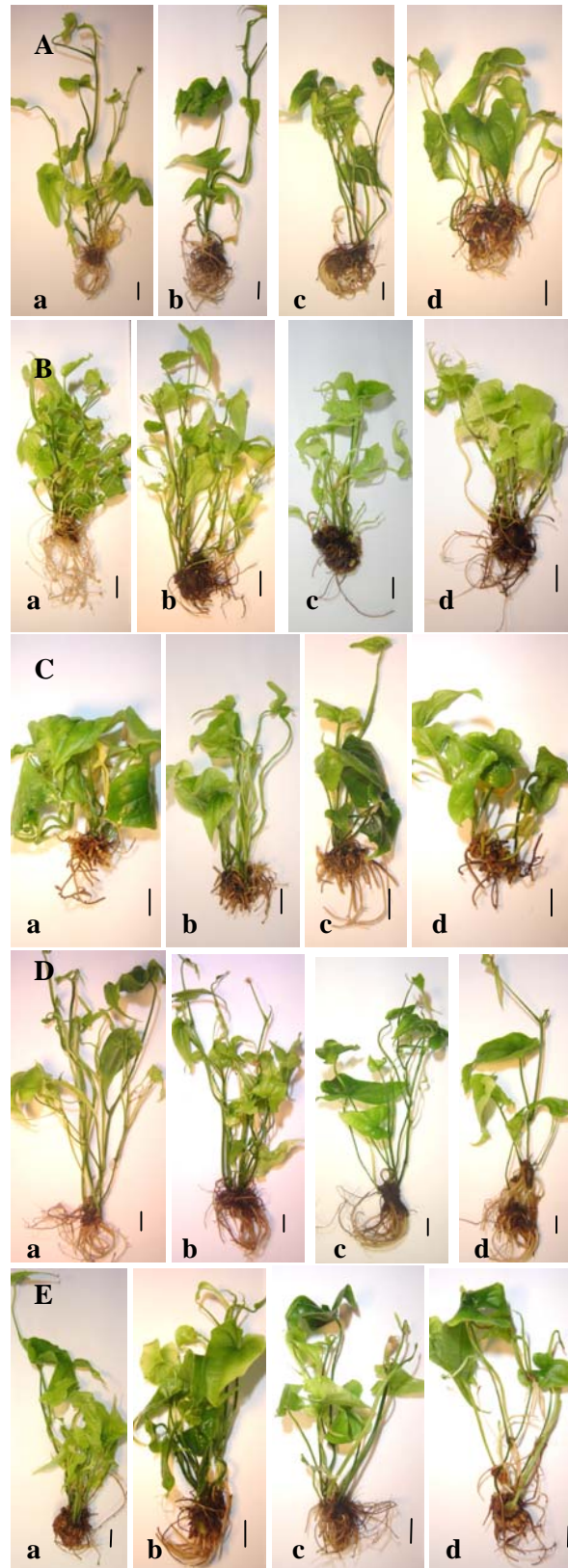


Figura 1. Plantas dos somaclones S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) de *Dioscorea composita* produzidas, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência (a) ou na presença de 2,5 μM (b), 5,0 μM (c) e 7,5 μM de GA_3 (d). (barra= 1cm)

Quando se compara o crescimento dos somaclones, para cada concentração de GA₃ utilizada (Tabela 5), observa-se que não foram detectadas diferenças entre os somaclones, com relação à massa seca da parte aérea, apenas nas concentrações de 5,0 µM e 7,5 µM de GA₃. Na ausência deste regulador, os somaclones S1, S4 e S5 apresentaram os maiores valores de massa seca da parte aérea em relação ao S2, enquanto que, na concentração de 2,5 µM o maior valor foi observado para o somaclone S4, que diferiu apenas do S3.

Tabela 5. Influência de diferentes concentrações de GA₃ sobre o crescimento e teor de água de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GA ₃ (µM)	Somaclones	MSA (mg) ^a	MST (mg) ^a	MST/MFT ^a	MST/MSA ^a	Teor de água (% MFT) ^a
0	S1	161,2 ab	130,2 b	0,26 a	0,81 b	73,6 b
	S2	93,3 c	209,4 a	0,20 b	3,00 a	79,9 a
	S3	142,3 b	134,6 b	0,25 a	0,97 b	74,7 b
	S4	171,8 ab	132,7 b	0,26 a	0,83 b	74,3 b
	S5	181,6 a	127,3 b	0,27 a	0,69 b	73,1 b
2,5	S1	100,0 ab	186,2 a	0,27 a	1,9 a	71,7 b
	S2	95,6 ab	174,8 a	0,24 b	1,9 a	76,0 a
	S3	85,0 b	120,4 a	0,25 ab	1,5 a	74,7 ab
	S4	120,6 a	164,5 a	0,27 a	1,4 a	73,0 b
	S5	111,7 ab	136,4 a	0,27 a	1,3 a	73,1 b
5,0	S1	83,8 a	163,2 a	0,27 ab	2,3 a	73,3 ab
	S2	88,5 a	193,5 a	0,24 b	3,1 a	76,4 a
	S3	76,2 a	161,5 a	0,27 ab	2,2 a	73,2 ab
	S4	77,8 a	174,1 a	0,28 a	2,4 a	71,7 b
	S5	100,3 a	154,4 a	0,28 a	1,6 a	71,9 b
7,5	S1	75,4 a	192,9 a	0,27 a	2,6 a	73,4 a
	S2*	58,9 a	153,9 a	0,26 a	5,2 a	73,6 a
	S3	68,9 a	103,0 a	0,27 a	1,6 a	73,1 a
	S4	75,1 a	192,9 a	0,27 a	2,6 a	73,4 a
	S5	80,6 a	202,9 a	0,27 a	2,9 a	73,3 a

^a Médias de pelo menos 7 repetições (*) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05). MSA= massa seca da parte aérea; MST= massa seca do microtúbulo; MFT= massa fresca do microtúbulo.

Não foram verificadas diferenças entre os somaclones, com relação à massa seca dos microtubérculos, na presença de GA₃ (Figura 2). Porém, na ausência deste regulador, os microtubérculos do somaclone S2 apresentaram valores superiores em relação aos demais somaclones. O mesmo tipo de resposta foi obtido para os valores da razão entre a massa seca

do microtúbculo e a massa seca da parte aérea. Apenas na concentração de 7,5 μM de GA_3 não foram detectadas diferenças entre os somaclones, já nas concentrações de 2,5 μM e 5,0 μM de GA_3 os valores de S4 e S5 foram maiores dos que os obtidos para o S2 e na ausência do regulador os valores observados para os somaclones S3, S4 e S5 foram superiores ao S1 e S2. Como decorrência, os teores de água foram os menores nos tratamentos acima mencionados.

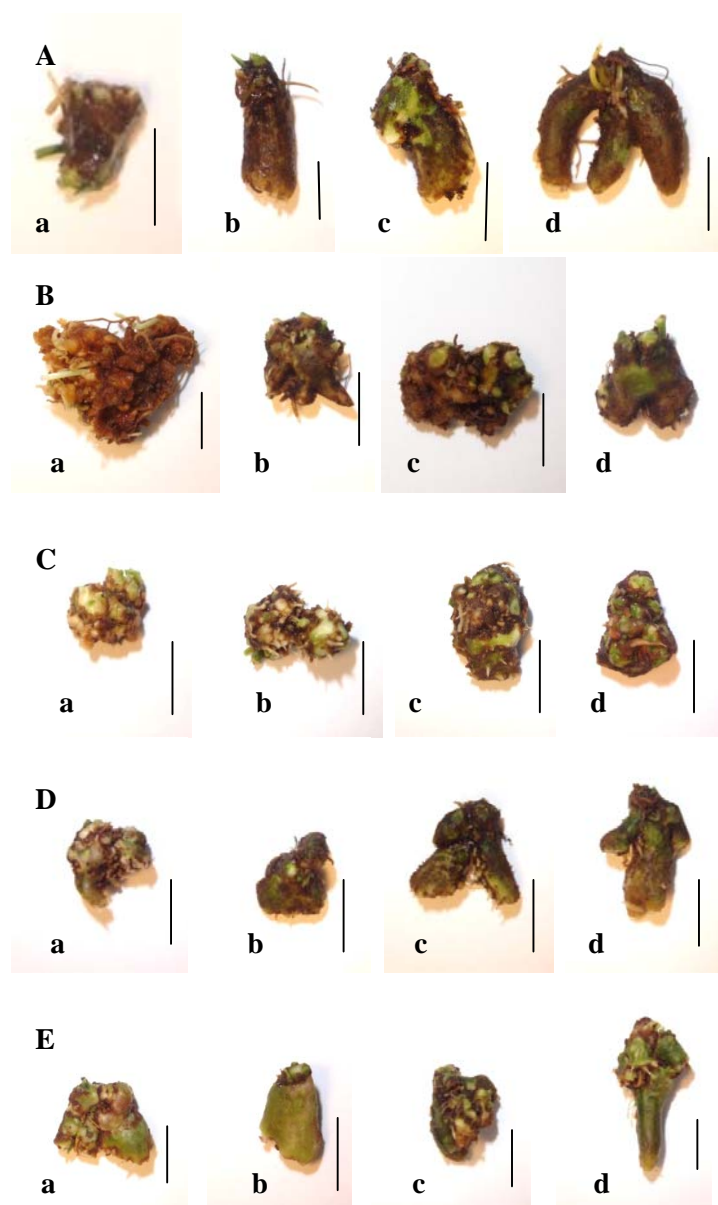


Figura 2. Microtubérculos dos somaclones S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 95-99 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na ausência (a) ou na presença de 2,5 μM (b), 5,0 μM (c) e 7,5 μM de GA_3 (d). (barra= 1cm).

4.3.2. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

4.3.2.1. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre a morfogênese das plantas

Os dados da Tabela 6 indicam que ramos, raízes e microtubérculos foram induzidos (Figura 3) em 100% das plantas dos somaclones S1 e S4 submetidas, durante diferentes períodos de tempo, em meio de cultura contendo GA₃. A percentagem de senescência das plantas do somaclone S1 foi maior quando mantidas por 30 ou 45 dias em contato com o regulador, enquanto que para o somaclone S4, quando expostas por 15 e 45 dias.

Tabela 6. Influência do tempo de permanência de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, com 126 dias de idade, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 µM de GA₃ sobre a morfogênese e senescência. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Tempo (dias)	Ramos ^a (%)	Raízes ^a (%)	Microtubérculos ^a (%)	Senescência ^a (%)
S1	0	100	100	100	0
	15	100	100	100	0
	30	100	100	100	33
	45	100	100	100	25
	122	100	100	100	0
S4	0	100	100	100	0
	15	100	100	100	25
	30	100	100	100	0
	45	100	100	100	17
	122	100	100	100	0

^a Valores são proporções calculadas com base em doze repetições por tratamento. MST= massa seca dos microtubérculos.

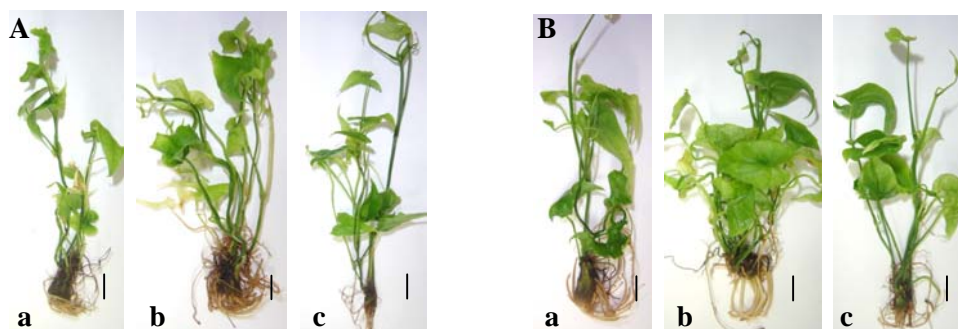


Figura 3. Plantas dos somaclones S1 (A) e S4 (B) de *Dioscorea composita* produzidas, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 126 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. As plantas permaneceram por 15 (a); 30 (b) e 45(c) dias em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na presença de 5,0 μM de GA_3 . (barra=1 cm).

4.3.2.2. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre o crescimento dos microtubérculos

A análise de variância multifatorial, realizada para avaliar os efeitos do tempo de permanência em GA_3 e dos somaclones, indicou interação apenas para a variável massa seca do microtubérculo, não sendo significativa para as variáveis de razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculo, teor de água em percentagem da massa fresca do microtubérculo, massa seca da parte aérea e razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea da planta. Verifica-se, pela Tabela 7, que os valores de massa seca obtidos para os tempos de permanência de 15 e 30 dias para o somaclone S1, e de 15 dias para o somaclone S4 foram superiores apenas ao valor observado para o tempo de permanência de 30 dias das plantas do somaclone S4, não diferindo dos demais tratamentos (Figura 4).

Tabela 7. Influência do tempo de permanência de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, com 126 dias de idade, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μM de GA_3 sobre o crescimento em massa seca de microtubérculos e da parte aérea. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Tempo (dias)	MST (mg) ^a
S1	0	130,2 ab
	15	202,3 a
	30	198,3 a
	45*	130,2 ab
	112	162,3 ab
S4	0	132,7 ab
	15*	209,8 a
	30	105,1 b
	45	137,4 ab
	112	175,7 ab

^a Médias de no mínimo 9 (*) repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MST= massa seca do microtubérculo.

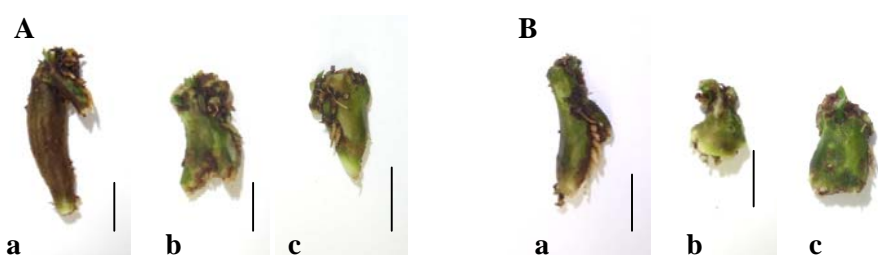


Figura 3. Microtubérculos dos somaclones S1 (A) e S4 (B) de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 126 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. As plantas permaneceram por 15 (a); 30 (b) e 45(c) dias em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na presença de 5,0 μM de GA_3 . (barra=1 cm).

Porém, quando se analisa o dado de percentagem de microtubérculos formados por classes de valores de massa seca, verifica-se que, tanto para o somaclone S1 quanto para o S4, não foram formados microtubérculos com massas secas superiores a 201 mg, quando as plantas não ficaram expostas ao GA_3 (Tabela 8). Para o somaclone S1, a exposição das plantas ao regulador de crescimento, durante 15 e 30 dias, elevou para 50% e 54%, respectivamente, a percentagem de microtubérculos maiores que 201 mg. Quando inoculadas por 45 dias com GA_3 , as plantas não formaram microtubérculos nesta classe de massa seca e, quando permaneceram todo o tempo em contato com o regulador, o valor caiu para 33%.

Verifica-se ainda que, no tratamento de exposição por 30 dias, apenas 9% dos microtubérculos tiveram massa seca inferior a 100 mg.

Para o somaclone S4, a exposição das plantas, por apenas 15 dias no meio de cultura contendo GA₃, fez com que 44% dos microtubérculos produzidos tivessem massa seca superior a 201 mg e com que nenhum microtubérculo, com massa seca menor que 100 mg, fosse formado. Contudo, as exposições por 30 e 45 dias, respectivamente, pareceram inibir totalmente ou reduzir a percentagem de microtubérculos formados nesta classe de massa seca. Observa-se que, no tempo de exposição por 30 dias, 42% dos microtubérculos produzidos foram menores que 100 mg de massa seca. De forma semelhante ao somaclone S1, apenas 33% dos microtubérculos foram produzidos com massa seca superior a 201 mg, quando as plantas permaneceram 122 dias em contato com o regulador de crescimento.

Tabela 8. Distribuição por frequência (%) de intervalos de classes de massa seca de microtubérculos e número total de microtubérculos formados por tratamento (entre parênteses) por diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 126 dias, que permaneceram em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μ M de GA₃, por diferentes períodos de tempo. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Tempo (dias)	Classes de MST (mg)	Somaclones	
		S1 ^a	S4 ^a
0	≤ 100	42 (12)	33 (12)
	101-150	8	17
	151-200	50	50
	201-300	0	0
	> 300	0	0
15	≤ 100	25 (12)	0 (9)
	101-150	0	33
	151-200	25	22
	201-300	33	33
	> 300	17	11
30	≤ 100	9 (11)	42 (12)
	101-150	18	50
	151-200	18	8
	201-300	45	0
	> 300	9	0
45	≤ 100	22 (9)	20 (10)
	101-150	44	50
	151-200	33	20
	201-300	0	10
	> 300	0	0
122	≤ 100	25 (12)	17 (12)
	101-150	33	17
	151-200	8	33
	201-300	25	33
	> 300	8	0

^a Valores de proporções calculadas com base no número total de microtubérculos formados de pelo menos nove repetições por tratamento. MST= massa seca dos microtubérculos.

Os dados da Tabela 9 indicam que, tanto para o somaclone S1 quanto para o S4, os diferentes tempos de permanência das plantas, em meio de cultura contendo GA₃, não provocou diferenças nos valores de razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculos e, conseqüentemente, no teor de água. Observa-se também que, para cada tempo de exposição ao regulador, não foram detectadas diferenças entre os somaclones. Contudo, para o somaclone S1, os valores de massa seca da parte aérea das plantas, que não foram expostas ao GA₃ ou que foram expostas por 30 e 45 dias, foram superiores aos obtidos nos tempos de exposição de 15 e 112 dias. Já para S4, a não exposição ao regulador provou o maior

incremento na massa seca da parte aérea. Também neste caso, não foram observadas diferenças entre os somaclones em nenhum dos tempos de exposição estudados.

Com relação aos valores de razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea, verifica-se que, para o somaclone S1, o maior valor foi obtido no tempo de exposição de 15 dias, diferindo dos tratamentos em que as plantas não foram expostas ao GA₃ ou permaneceram em meio de cultura contendo esse regulador por 30 e 45 dias. Para o somaclone S4, os maiores valores foram obtidos nos tempos de exposição de 15 e 112, diferindo dos obtidos quando as plantas não foram expostas ao GA₃ ou quando expostas por 30 dias. Apenas no tempo de exposição de 30 dias o valor apresentado pelo somaclone S1 foi superior ao do S4.

Tabela 9. Influência do tempo de permanência de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, com 126 dias de idade, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 µM de GA₃ sobre as razões entre massa seca e massa fresca dos microtubérculos e entre massa seca do microtubérculo e massa seca da parte aérea. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclone	Tempo (dias)				
	0	15	30	45	112
	MST/MFT ^a				
S1	0,26 Aa	0,29 Aa	0,25 Aa	0,30 Aa	0,27 Aa
S4	0,26 Aa	0,27 Aa	0,27 Aa	0,28 Aa	0,29 Aa
	Teor de água (% MF) ^a				
S1	74 Aa	71 Aa	75 Aa	71 Aa	73 Aa
S4	74 Aa	73 Aa	73 Aa	72 Aa	72 Aa
	MSA (mg) ^a				
S1	161,2 Aa	85,8 Ab	151,4 Aa	128,8 Aa	83,8 Ab
S4	171,8 Aa	86,1 Acd	156,8 Aab	126,2 Abc	77,8 Ad
	MST/MSA ^a				
S1	0,8 Ac	2,7 Aa	1,3 Abc	1,2 Abc	2,4 Aab
S4	0,8 Ab	2,5 Aa	0,7 Bb	1,5 Aab	2,4 Aa

^a Médias de no mínimo 9 repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) e com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca. MFT= massa fresca do microtubérculo; MST= massa seca do microtubérculo; MSA= massa seca da parte aérea.

4.3.2.3. Efeito do período de permanência das plantas em meio de cultura contendo ácido giberélico sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas

A análise de variância multifatorial, realizada para avaliar os efeitos do tempo de permanência em GA₃ e dos somaclones sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas, indicou interação significativa entre estes fatores apenas para a variável massa seca das raízes, não sendo significativa para as variáveis de números de folhas, de nós, de gemas e de ramos e comprimento do maior ramo por planta. Verifica-se, pela Tabela 10, que os menores valores de massa seca das raízes foram observados, para ambos os somaclones, no tratamento em que as plantas permaneceram 112 dias em contato com o meio de cultura contendo GA₃. Esses valores diferiram dos tratamentos de não exposição das plantas ao regulador de crescimento, tanto para S1 quanto para S4 e do tratamento com o somaclone S1 em que as plantas foram expostas por 30 dias ao GA₃.

Tabela 10. Influência do tempo de permanência de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, com 126 dias de idade, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 µM de GA₃ sobre o crescimento em massa seca do sistema radicular das plantas. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Tempo (dias)	MSR ^a * (mg)
S1	0	76,7 ab
	15	46,9 bc
	30	95,6 a
	45	66,8 abc
	112	42,3 c
S4	0	77,6 a
	15	47,8 bc
	30	45,3 bc
	45	48,0 bc
	112	41,4 c

^a Médias de no mínimo 9 repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤ 0,05). * = interação significativa; MSR= massa seca do sistema radicular.

Na Tabela 11 são apresentados os dados dos números de folhas, de nós, de gemas e de ramos, produzidos por planta, e do comprimento do maior ramo observados após os diferentes tempos de permanência das plantas em meio de cultura contendo GA₃.

Tabela 11. Influência do tempo de permanência de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita*, com 126 dias de idade, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 µM de GA₃ sobre o crescimento da parte aérea. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclone	Tempo (dias)				
	0	15	30	45	112
	Nº de folhas ^a				
S1	18,8 Aab	12,9 Abc	20,3 Aa	17,0 Aabc	10,0 Ac
S4	21,5 Aa	13,7 Aa	21,3 Aa	15,1 Ab	10,5 Ab
	Nº de nós ^a				
S1	18,8 Aa	10,6 Ab	19,7 Aa	15,0 Aab	9,0 Ab
S4	19,6 Aa	11,3 Ab	19,4 Aa	15,1 Aab	9,7 Ab
	Nº de gemas ^a				
S1	29,8 Aa	17,5 Ab	31,5 Aa	24, 3 Aab	14,8 Ab
S4	29,4 Aa	18,6 Ab	30,7 Aa	22,8 Aab	15,1 Ab
	Nº de ramos ^a				
S1	4,9 Aa	2,4 Ab	4,2 Aa	3,4 Aab	2,3 Ab
S4	4,8 Aa	2,7 Ab	5,3 Aa	4,0 Aab	2,3 Ab
	Comprimento do maior ramo (cm) ^a				
S1	3,9 Aa	2,3 Aa	3,0 Aa	2,3 Ba	2,6 Aa
S4	3,9 Aa	2,3 Aa	2,9 Aa	4,1 Aa	2,4 Aa

^a Médias de no mínimo 9 repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) e com teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Verifica-se que, o número de folhas produzidas por planta do somaclone S1 foi maior com 30 dias de exposição e não diferiu dos tratamentos com 45 dias de exposição e daquele em que as plantas não foram expostas ao regulador de crescimento. O somaclone S4 apresentou respostas semelhantes, sendo os maiores valores dos números de folhas observados na ausência de exposição ou na exposição por 30 dias. Não foram detectadas diferenças entre os somaclones em nenhum dos tempos de exposição estudados (Figura 4).

Com relação aos números de nós, de gemas e de ramos observa-se que as respostas dos somaclones S1 e S4 foram idênticas, indicando que os tratamentos promotores foram a

não exposição ao GA₃ ou a exposição por 30 dias. Novamente, não foram observadas diferenças entre os somaclones em nenhum dos tempos de exposição ao regulador (Figura 4).

Para ambos os somaclones, o comprimento do maior ramo não foi influenciado por nenhum dos períodos de permanência das plantas em meio de cultura contendo GA₃. Não houve diferença entre os somaclones em nenhum dos tempos de exposição testados, exceto no de 45 dias, em que o somaclone S4 apresentou maior comprimento de ramo em relação a S1 (Figura 4).

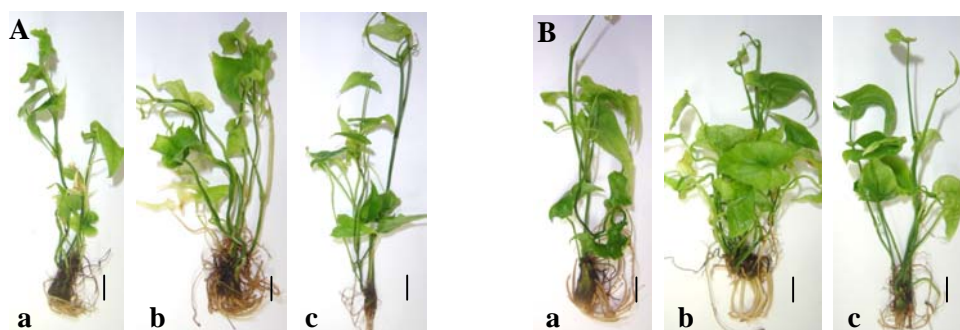


Figura 4. Plantas dos somaclones S1 (A) e S4 (B) de *Dioscorea composita* produzidas a partir do cultivo de plantas, com 126 dias de idade, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose. As plantas permaneceram por 15 (a); 30 (b) e 45(c) dias em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na presença de 5,0 µM de GA₃. (barra=1 cm).

4.3.3. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro*

4.3.3.1. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre a morfogênese das plantas

Os resultados da Tabela 12 indicam que as plantas dos diferentes somaclones, dependendo da concentração de ANA, apresentaram quatro diferentes respostas de

morfogênese: formação de ramos, de raízes, de bulbilhos aéreos e/ou microtubérculos. Em todos os tratamentos, 100% das plantas desenvolveram novos ramos, raízes e microtubérculos.

Tabela 12. Influência de diferentes concentrações de ANA sobre a morfogênese e senescência de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124-173 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μM de GA_3 . Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	ANA (μM)	Ramos ^a (%)	Raízes ^a (%)	Microtubérculos ^a (%)	Bulbilhos Aéreos ^a (%)	Senescência ^a (%)
S1	0	100	100	100	0	0
	2,5	100	100	100	0	0
	5,0	100	100	100	0	33,3
S2	0	100	100	100	16,7	0
	2,5	100	100	100	0	41,7
	5,0	100	100	100	0	33,3
S3	0	100	100	100	0	8
	2,5	100	100	100	0	16,7
	5,0	100	100	100	0	8,3
S4	0	100	100	100	0	0
	2,5	100	100	100	0	0
	5,0	100	100	100	0	16,7
S5	0	100	100	100	0	0
	2,5	100	100	100	16,7	0
	5,0	100	100	100	0	66,7

^a Valores são proporções calculadas com base em doze repetições por tratamento.

Não houve relação entre a concentração de ANA e a formação de bulbilhos aéreos, já que os somaclones S2 e S5 foram os únicos que formaram estes órgãos. O somaclone S2 formou bulbilhos aéreos com massa seca média de 31 mg na ausência de ANA e as plantas do somaclone S5 formaram bulbilhos aéreos com massa seca média de 28 mg em meio de cultura contendo 2,5 μM de ANA.

A presença de ANA no meio de cultura influenciou a percentagem de senescência das plantas, uma vez que na ausência deste regulador, todas as plantas, de todos os somaclones, sobreviveram, exceto para o somaclone S3. Na presença de 2,5 μM de ANA os somaclones S2 e S3 apresentaram senescência, tendo S2 a maior percentagem observada (42%). Quando

na presença de 5 μM de ANA, ocorreu senescência em todos os somaclones, onde S3 apresentou a menor percentagem (8%) e o S5 a maior (66,7%).

4.3.3.2. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre o crescimento dos microtubérculos

Os resultados da Tabela 13 indicam que, para todos os somaclones, o crescimento em massa seca dos microtubérculos (Figura 5) e a razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea da planta não diferiram na ausência ou na presença de ANA. Contudo, para todos os somaclones, exceto o S2, foram detectadas diferenças entre os tratamentos com relação à razão entre as massas seca e fresca do microtubérculo e conseqüentemente, com relação ao teor de água. Verifica-se que, os menores valores de massa seca do microtubérculo por unidade de massa fresca foram observados, em todos os somaclones, nas concentrações de 2,5 μM e 5,0 μM de ANA. No caso dos somaclones S4 e S5 os valores observados nestas concentrações diferiram do tratamento em que o ANA não foi adicionado ao meio de cultura enquanto que, no caso dos somaclones S1 e S3 apenas os valores obtidos na concentração de 5,0 μM de ANA diferiram do tratamento sem o regulador. Por conseguinte, as mesmas diferenças foram observadas em relação às variações no teor de água dos microtubérculos, sendo maiores na presença de ANA.

Tabela 13. Influência de diferentes concentrações de ANA sobre o crescimento e teor de água de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124-173 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μM de GA_3 . Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	ANA (μM)	MST (mg) ^a	MST/MFT ^a	MST/MSA ^a	Teor de água (% MF) ^a
S1	0	204,7 a	0,30 a	2,4 a	69,5 b
	2,5	200,9 a	0,27 ab	2,4 a	73,1 ab
	5,0	248,3 a	0,22 b	3,1 a	77,9 a
S2	0	174,7 a	0,23 a	2,4 a	76,7 a
	2,5	208,6 a	0,22 a	2,7 a	78,5 a
	5,0	206,1 a	0,21 a	5,2 a	78,9 a
S3	0	185,9 a	0,26 a	2,0 a	74,2 b
	2,5	147,7 a	0,25 ab	2,1 a	74,7 ab
	5,0	154,6 a	0,23 b	2,6 a	76,9 a
S4	0	175,7 a	0,28 a	2,0 a	71,2 b
	2,5	218,3 a	0,23 b	2,0 a	76,8 a
	5,0	194,4 a	0,22 b	2,8 a	77,9 a
S5	0	179,1 a	0,29 a	1,6 a	71,1 b
	2,5	176,2 a	0,25 b	1,7 a	74,6 a
	5,0*	144,0 a	0,23 b	1,8 a	77,0 a

^a Médias de pelo menos 4 repetições (*) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MST= massa seca do microtubérculo; MFT= massa fresca do microtubérculo; MSA= massa seca da parte aérea.

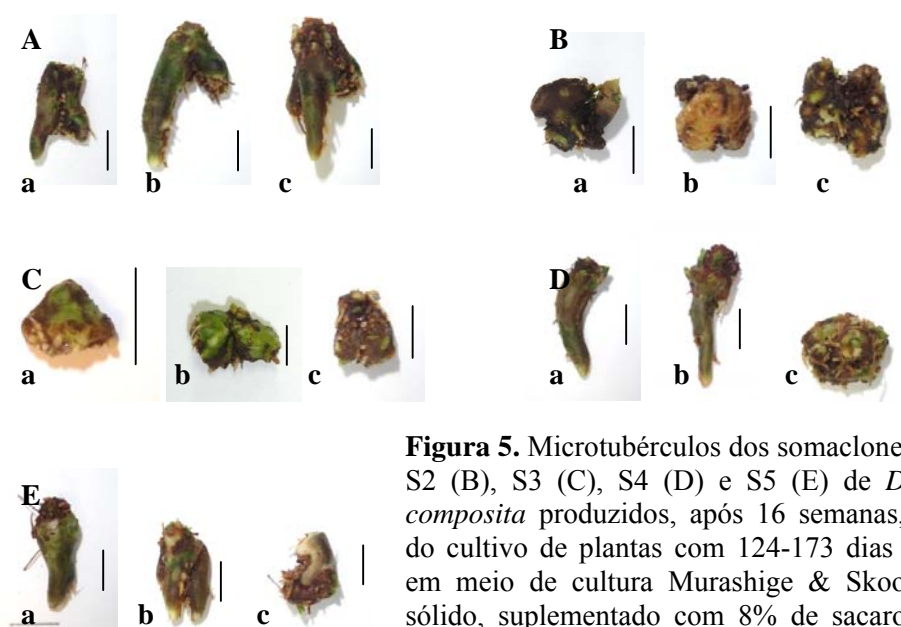


Figura 5. Microtubérculos dos somaclones S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124-173 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5,0 μM de GA_3 , na ausência (a) ou presença de 2,5 μM (b) e 5,0 μM de ANA (c). (barra=1cm).

Quando se analisa a distribuição da percentagem de microtubérculos produzidos por classes de intervalos de massa seca verifica-se, pela Tabela 14, que para o somaclone S1 a

maior percentagem de microtubérculos com massa seca superior a 201 mg foi formada na ausência de ANA (50%) ou na concentração de 5,0 μM de ANA (63%), e nesta concentração não houve a formação de microtubérculos com massa seca inferior a 100 mg. O somaclone S2 não formou microtubérculos menores que 100 mg de massa seca, em nenhum dos tratamentos, porém nos tratamentos com 2,5 μM e 5,0 μM de ANA a percentagem de formação de microtubérculos maiores que 201 mg foi, respectivamente, de 71% e 50% contra apenas 33% formados na ausência de ANA. O somaclone S3 formou 46% e 42% de microtubérculos maiores que 201 mg nos tratamentos sem ANA e na presença de 2,5 μM de ANA, respectivamente, mas nesta última concentração 17% dos microtubérculos tinham massa seca superior a 300 mg. Contudo, com 5,0 μM de ANA apenas 9% deles tiveram massa seca maior que 201 mg. Um aspecto importante é que na ausência de ANA não foram formados microtubérculos menores que 100 mg, enquanto que com 2,5 μM foram formados 17%.

Os resultados obtidos para o somaclone S4 indicam que em todos os tratamentos foram produzidos de 50% a 58% de microtubérculos com massa seca entre 201-300 mg, mas não foram formados microtubérculos com massa seca maior que 300 mg. Entretanto, no tratamento com 2,5 μM de ANA não foram produzidos microtubérculos com massa seca menor que 100 mg e no tratamento com 5,0 μM a percentagem observada de microtubérculos nesta categoria foi de apenas 10%. O somaclone S5 produziu 50% e 33% de microtubérculos maiores que 201 mg de massa seca na ausência de ANA e na presença de 2,5 μM de ANA, respectivamente. Embora, nesta última concentração não foram formados microtubérculos com massa seca menor que 100 mg enquanto que, na ausência de ANA, 33% dos mesmos tiveram essa massa seca. Na concentração de 5,0 μM de ANA não foi observada a formação de microtubérculos maiores que 151 mg.

Tabela 14. Distribuição por frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de microtubérculos e número total de microtubérculos formados por tratamento (valores entre parênteses) nos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas de 124-173 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, 5 μ M de GA₃, na ausência ou presença de diferentes concentrações de ANA. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

ANA (μ M)	Classes de MST (mg)	Somaclones ^a				
		S1	S2	S3	S4	S5
0	≤ 100	8 (12)	0 (12)	0 (11)	17 (12)	33 (12)
	101-150	8	42	18	17	17
	151-200	33	25	36	17	0
	201-300	50	33	46	50	33
	> 300	0	0	0	0	17
2,5	≤ 100	20 (10)	0 (7)	17 (12)	0 (12)	0 (12)
	101-150	40	14	25	0	25
	151-200	30	14	17	42	42
	201-300	10	71	25	58	33
	> 300	0	0	17	0	0
5,0	≤ 100	0 (8)	0(8)	9 (11)	10 (10)	25 (4)
	101-150	13	0	27	0	75
	151-200	25	50	56	50	0
	201-300	38	50	9	50	0
	> 300	25	0	0	0	0

^a Valores são proporções calculadas com base no número total de microtubérculos formados de pelo menos sete repetições por tratamento. MST= massa seca dos microtubérculos.

4.3.3.3. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas

Os resultados sobre o crescimento da parte aérea e das raízes das plantas dos diferentes somaclones, quando cultivadas em meio de cultura contendo 5 μ M de GA₃ e diferentes concentrações de ANA, são mostrados na Tabela 15 e na Figura 6.

Para o somaclone S1, a presença de ANA no meio de cultura não promoveu diferenças entre os tratamentos com relação as variáveis de massa seca da parte aérea e números de nós, de gemas e de ramos. Entretanto, diferenças entre os tratamentos foram detectadas com relação as demais variáveis, onde para as variáveis número de folhas e razão entre a massa

seca e a massa fresca da parte aérea, os resultados na presença de ANA foram inferiores aos obtidos na testemunha, caracterizado pela ausência de ANA. Ao contrário, a massa seca das raízes foi promovida na presença de ANA. Além disso, as plantas apresentaram, quando na presença de 2,5 μM de ANA, maior comprimento do ramo. A interação entre diferentes concentrações de ANA com GA_3 não manifestou diferenças para o somaclone S2, visto que, em nenhuma das variáveis analisadas os resultados obtidos na presença de ANA foram superiores a testemunha.

Resultados semelhantes ao S1 foram observados para as plantas do somaclone S3, exceto para as variáveis de massa seca das raízes, número de folhas e comprimento do maior ramo, que não diferiram entre os tratamentos. As respostas das plantas dos somaclones S4 e S5 diferiram das do somaclone S3 apenas com relação ao efeito promotor da massa seca das raízes quando na presença de ANA. Com relação ao comprimento do maior ramo não houve diferença entre os tratamentos para o somaclone S5 e a presença de 5,0 μM de ANA inibiu o crescimento do ramo das plantas do somaclone S4 e também o número de ramos.

Tabela 15. Influência de diferentes concentrações de ANA sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124-173 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μ M de GA₃. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	ANA (μ M)	MSA (mg) ^a	MSA/MFA ^a	MSR (mg) ^a	Nº de folhas ^a	Nº de nós ^a	Nº de gemas ^a	Nº de ramos ^a	Comprimento do > ramo (cm) ^a
S1	0	91,4 a	0,17 a	47,4 b	10,8 a	11,0 a	16,2 a	3,0 a	2,8 b
	2,5	107,3 a	0,16 ab	107,4 a	7,5 b	8,4 a	13,1 a	3,0 a	4,8 a
	5,0	90,7 a	0,14 b	94,2 a	9,7 ab	10,6 a	16,4 a	2,4 a	4,0 ab
S2	0	92,2 a	0,14 a	25,2 a	29,1 a	24,5 a	41,8 a	5,6 a	1,3 a
	2,5	94,3 a	0,13 a	29,3 a	22,6 ab	19,6 ab	34,3 ab	3,7 ab	1,5 a
	5,0	56,6 a	0,12 a	26,7 a	15,7 b	10,9 b	17,2 b	2,9 b	1,0 a
S3	0	94,5 a	0,16 a	63,2 a	15,7 a	14,5 a	23,8 a	2,6 a	0,7 a
	2,5	93,4 a	0,15 ab	66,4 a	17,4 a	16,6 a	27,5 a	3,5 a	0,9 a
	5,0	68,2 a	0,14 b	56,4 a	13,5 a	11,4 a	17,4 a	2,5 a	0,8 a
S4	0	99,0 a	0,18 a	47,2 b	13,0 a	12,2 a	19,2 a	2,8 ab	3,1 ab
	2,5	115,2 a	0,15 b	95,0 a	10,2 a	11,0 a	16,7 a	3,2 a	4,6 a
	5,0	87,2 a	0,16 ab	81,1 a	8,9 a	8,8 a	12,3 a	1,9 b	2,4 b
S5	0	113,1 a	0,17 a	64,4 b	13,2 a	13,1 a	19,2 a	2,7 a	3,1 a
	2,5	106,5 a	0,15 b	100,6 a	10,5 a	10,6 a	16,0 a	2,6 a	3,6 a
	5,0	88,2 a	0,15 b	81,5 ab	10,8 a	9,3 a	14,3 a	3,3 a	3,6 a

^a Médias de pelo menos quatro repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MSA= massa seca da parte aérea; MFA= massa fresca da parte aérea; MSR= massa seca da raiz.

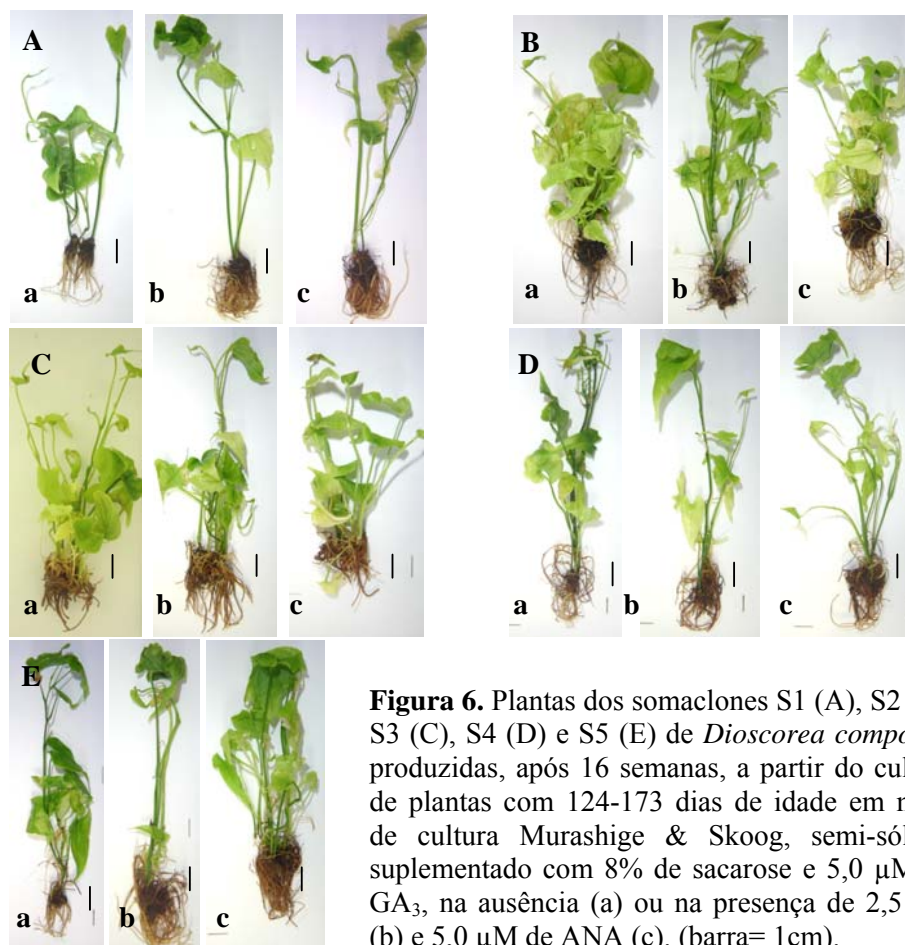


Figura 6. Plantas dos somaclones S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) de *Dioscorea composita* produzidas, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124-173 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5,0 μM de GA_3 , na ausência (a) ou na presença de 2,5 μM (b) e 5,0 μM de ANA (c). (barra= 1cm).

4.3.4. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a morfogênese das plantas e o crescimento *in vitro*

4.3.4.1. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a morfogênese das plantas e o crescimento dos microtubérculos

Em todos os tratamentos todas as plantas apresentaram, ao final do experimento, ramos, raízes e microtubérculos. A percentagem de senescência foi de 17% para o somaclone

S1 e de 8% para o S2, ocorrendo, em ambos os casos nos tratamentos com 2,73 mM de glutamina. Não foi observada a formação de bulbilhos aéreos em nenhum dos tratamentos.

A análise de variância multifatorial realizada para avaliar os efeitos da concentração de glutamina e dos somaclones indicou interação significativa entre estes fatores apenas para as variáveis razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculos e o teor de água em percentagem de massa fresca dos microtubérculos, não sendo significativa para as variáveis massa seca dos microtubérculos e da parte aérea e razão entre as massas secas do microtubérculo e da parte aérea. Observa-se, pela Tabela 16, que o maior valor de razão entre as massas seca e fresca dos microtubérculos, e conseqüentemente, o menor teor de água, foi obtido para as plantas do somaclone S4, na presença de 2,73 mM de glutamina. Esse resultado diferiu de todos os demais tratamentos exceto do somaclone S1, com 4,10 mM de glutamina.

Tabela 16. Efeito de diferentes concentrações de glutamina sobre os teores massa seca por unidade de massa fresca e de água de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μ M de GA₃. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Glutamina (mM)	MST/MFT ^{a *}	Teor de água (% MFT) ^{a *}
S1	0	0,27 ab	73,0 a
	2,73	0,27 ab	72,7 a
	4,10	0,29 a	70,9 ab
S4	0	0,27 b	72,8 a
	2,73	0,31 a	69,2 b
	4,10	0,27 b	73,5 a

^a Médias de no mínimo 10 repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * = interação significativa; MFT= massa fresca do microtubérculo, MST= massa seca do microtubérculo.

Os resultados da Tabela 17 indicam que, para cada somaclone, as concentrações de glutamina não provocaram diferenças em relação a testemunha, caracterizada pela ausência de glutamina, para as variáveis de valores de massa seca da parte aérea, massa seca do microtubérculo e razão entre as massas secas do microtubérculos e da parte aérea das plantas.

Também não foram detectadas diferenças, entre os somaclones, em nenhuma das concentrações de glutamina testadas.

Tabela 17. Efeito de diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento em massa seca da parte aérea e de microtubérculos de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de plantas com 124 dias de idade em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose e 5 μ M de GA₃. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Glutamina (mM)		
	0	2,73	4,10
	MSA ^a		
S1	76,6 Aa	88,4 Aa	78,6 Aa
S4	93,8 Aa	74,6 Aa	82,1 Aa
	MST ^a		
S1	178,4 Aa	158,4 Aa	144,5 Aa
S4	174,3 Aa	156,7 Aa	187,3 Aa
	MST/MSA ^a		
S1	2,6 Aa	1,9 Aa	1,8 Aa
S4	2,2 Aa	2,2 Aa	2,5 Aa

^a Médias de no mínimo 10 repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) e com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MST= massa seca do microtubérculo; MSA= massa seca da parte aérea.

Os resultados da Tabela 18 parecem indicar que, na presença de glutamina, houve tendência de aumentar a proporção de microtubérculos com massas secas menores que 100 mg em relação ao tratamento testemunha (17%). Para o somaclone S1 os valores foram de 30% e 33% e para o somaclone S4 de 36% e 25%, nas concentrações de 2,73 mM e 4,10 mM de glutamina, respectivamente. Por outro lado, estes tratamentos pareceram não favorecer o aumento da proporção de microtubérculos com massas secas maiores que 301 mg.

Tabela 18. Distribuição por frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de microtubérculos e número total de microtubérculos formados por tratamento (entre parênteses) por diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 12 semanas, a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, 5 µM de GA₃ na ausência ou presença de diferentes concentrações de glutamina. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Glutamina (Mm)	Classes de MST (mg) ^a	Somaclones	
		S1	S4
0	≤ 100	17 (12)	17 (12)
	101-150	33	17
	151-200	8	33
	201-300	33	33
	> 300	8	0
2,73	≤ 100	30 (10)	36 (11)
	101-150	10	18
	151-200	20	27
	201-300	30	18
	> 300	0	0
4,10	≤ 100	33 (12)	25 (12)
	101-150	25	17
	151-200	17	17
	201-300	17	33
	> 300	8	8

^a Valores de proporções calculadas com base no número total de microtubérculos formados de pelo menos dez repetições por tratamento. MST= massa seca dos microtubérculos.

4.3.4.2. Efeito do ácido giberélico em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas

As diferentes concentrações de glutamina não induziram diferenças na razão entre as massas seca e fresca da parte aérea, nos números de folhas, de nós, de gemas e de ramos e no comprimento do maior ramo das plantas dos somaclones S1 e S4 em relação a testemunha (Tabela 19). Verifica-se que, para o somaclone S1, não houve diferença entre os tratamentos com relação à massa seca das raízes, contudo para o somaclone S4 foi verificada diminuição da massa seca das raízes quando as plantas foram cultivadas na presença de 2,73 mM de glutamina.

Tabela 19. Influência de diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos, após 16 semanas, a partir do cultivo de segmentos nodais caulinares contendo gema axilar foliar em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, na presença de 5 μ M de GA₃. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Glutamina (mM)	MSA/MFA ^a	MSR (mg) ^a	Nº de folhas ^a	Nº de nós ^a	Nº de gemas ^a	Nº de ramos ^a	Comprimento do > ramo (cm) ^a
S1	0	0,16 a	44,7 a	11,3 a	9,4 a	14,1 a	2,7 a	3,1 a
	2,73	0,17 a	39,0 a	13,1 a	12,5 a	20,0 a	2,9 a	2,9 a
	4,10	0,16 a	28,5 a	12,6 a	10,2 a	17,3 a	2,8 a	2,2 a
S4	0	0,17 a	47,8 a	12,3 a	12,4 a	18,6 a	3,0 a	3,0 a
	2,73	0,18 a	24,3 b	13,5 a	9,7 a	15,8 a	2,8 a	2,8 a
	4,10	0,17 a	41,9 a	10,7 a	9,3 a	14,9 a	2,5 a	2,5 a

^a Médias de pelo menos dez repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MSA= massa seca da parte aérea; MFA= massa fresca da parte aérea; MSR= massa seca da raiz.

4.4. DISCUSSÃO

Raras são as informações na literatura sobre o potencial do ácido giberélico na morfogênese, crescimento e tuberização de plantas do gênero *Dioscorea*. As giberelinas pertencem a uma grande família de compostos diterpênicos, onde o ácido giberélico apresenta função de controle de muitos processos do desenvolvimento vegetal (Davies, 1995).

A formação de bulbilhos aéreos, na presença de diferentes concentrações de GA₃, proporciona mais uma fonte de propagação vegetativa de *Dioscorea composita*, juntamente com os microtubérculos que foram induzidos na presença deste regulador de crescimento.

O GA₃ é considerado um inibidor do processo de tuberização em vários sistemas (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 2004), mesmo quando outras condições são indutoras deste processo (Vreugdenhil *et al.*, 1998). De acordo com Figueiredo-Ribeiro *et al.* (2004), aplicações de GA₃ mimetizam os efeitos de condições ambientais não indutivas da tuberização, por isso, esse regulador de crescimento pode ser considerado controlador do processo de tuberização. A presença de GA₃ no meio de cultura também não se mostrou

eficiente na indução de microtubérculos em explantes de *Solanum tuberosum*, sendo raramente observada, mesmo em alta concentração de sacarose (Vreugdenhil *et al.*, 1998), um dos requisitos para indução de tuberização nessa espécie (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 2004). Entretanto, nos experimentos conduzidos no presente trabalho, esse regulador de crescimento não inibiu a indução dos microtubérculos e nem o acúmulo de massa seca pelos mesmos, em nenhuma das concentrações estudadas, mas alterou a morfologia dos mesmos em relação aos tratamentos com ausência desse regulador, indicando uma possível atuação do regulador de crescimento na direção dos eixos de divisão e/ou expansão celular propiciando a formação de microtubérculos alongados.

O fato de o GA₃ não promover o aumento da massa seca dos microtubérculos, em comparação com o tratamento sem este regulador de crescimento, poderia ser explicado por um efeito promotor, similar ao que ocorre em sementes de cevada, sobre a ativação das amilases, que poderiam reduzir o acúmulo de amido pelas células (Taiz & Zeiger, 2004). Isto explicaria também os resultados obtidos para os experimentos sobre os efeitos dos diferentes tempos de permanência em meio contendo GA₃, que indicaram que a permanência das plantas por um período prolongado, na presença desse regulador de crescimento, não favoreceu o incremento em massa seca dos microtubérculos.

A constatação de 15 dias ser o tempo mínimo suficiente de exposição das plantas ao GA₃ para garantir maior massa seca, maior proporção de microtubérculos com massa seca maior que 201 mg e menor proporção de microtubérculos menores que 100 mg de massa seca é um resultado relevante para otimizar a produção de biomassa para produção de metabólitos secundários. Esse resultado, também confirmado nos experimentos sobre o efeito de diferentes concentrações desse regulador, demonstra que, exceto para o somaclone S5, a presença de GA₃ no meio de cultura foi necessária para aumentar a proporção de microtubérculos com massas secas maiores que 201 mg e diminuir a proporção daqueles com

massas secas menores que 100 mg, sendo que a concentração ótima desse regulador, para assegurar esta condição, variou para cada somaclone. Entretanto, estas concentrações ótimas de GA₃ (2,5 µM, para o somaclone S1, 5,0 µM para o S2 e S3, 7,5 µM para o S4 e ausência de GA₃ para o S5) não coincidiram com aquelas em que foi observada a maior percentagem de senescência das plantas. Desta forma, apesar de o GA₃ não ter contribuído para aumentar a massa seca dos microtubérculos, em relação a testemunha, na ausência deste regulador de crescimento como mencionado acima, a possibilidade de se produzir, na presença do mesmo, percentagem maior de microtubérculos com maiores massas secas é vantajosa, pois implicaria na diminuição nos custos de produção.

A constatação de que as plantas dos diferentes somaclones de *D. composita* também apresentaram menor percentagem de sobrevivência no meio de cultura com a adição GA₃, especialmente quando na sua maior concentração, poderia estar relacionada com toxicidade. A maior razão entre a massa seca dos microtubérculos e da parte aérea das plantas em meio de cultura contendo GA₃, especialmente nas maiores concentrações, em comparação com as plantas inoculadas na ausência do regulador, exceto para o somaclone S2, é devido também ao não incremento do crescimento da parte aérea das plantas, observado na presença desse regulador de crescimento.

Os resultados de redução do crescimento da parte aérea das plantas cultivadas na presença do GA₃ no meio de cultura deve-se principalmente por uma das suas características: alongamento do caule de plantas anãs (Taiz & Zeiger, 2004), característica de crescimento anormal não observada nas plantas dos diferentes somaclones. Além disso, as giberelinas regulam seu próprio metabolismo (Olszewski *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2004), cuja transcrição de genes codificadores de enzimas responsáveis pela sua biossíntese ou degradação pode ser inibida. Sendo assim, giberelinas exógenas provocam a diminuição da expressão dos genes da biossíntese e o aumento da transcrição de genes de degradação (Taiz

& Zeiger, 2004). O fato de os resultados demonstrarem não haver necessidade de se manter as plantas por mais de 30 dias em meio de cultura com GA₃, para que o ótimo crescimento da parte aérea seja atingido, com relação aos números de folhas, de nós, de gemas e de ramos, é interessante, pois aponta para mais um detalhe que deve ser levado em consideração na otimização dos protocolos de produção de plantas. Isto porque, um tempo de permanência maior em contato com esse regulador de crescimento pode passar a inibir o crescimento das mesmas, incluindo o do sistema radicular e interferir na capacidade de aclimatização, o que pode influenciar a viabilidade econômica da cultura de tecidos vegetais, caso o objetivo seja comercial.

Diferenças nas respostas de crescimento da parte aérea das plantas, sob diferentes concentrações de GA₃, foram observadas por Schoene & Yeager (2005) estudando *Viburnum odoratissimum*. Os autores verificaram relação direta entre o aumento do número de nós e o aumento da concentração do regulador de crescimento. A mesma relação foi observada para a variável de comprimento do ramo, principalmente quando os autores utilizaram concentração de GA₃ de 2,8 µM. A resposta encontrada para a referida espécie foi inferior a todas as respostas observadas para *Dioscorea composita*.

Tais respostas encontradas para os experimentos de utilização isolada de giberelina aliada ao fato de que, segundo Caldas *et al.* (1998), poucas culturas *in vitro* mostram respostas a essa classe de reguladores de crescimento, estimulou a realização dos experimentos para testar o efeito da aplicação do GA₃ em combinação com o ANA. A explicação para o incremento da massa seca das raízes, e não da parte aérea das plantas inoculadas na presença de ANA, se deve à característica das auxinas em promover o crescimento do sistema radicular (Davies, 1995; Arteca, 1996; Taiz & Zeiger, 2004). A ineficiência da interação ANA e GA₃ em promover aumento das variáveis avaliadas para a parte aérea e radicular em *D. composita* não foi observada nos experimentos de Schoene & Yeager (2005) com *Viburnum*

odoratissimum. Neste caso, a presença de auxina incrementou a parte aérea, além do sistema radicular. Entretanto, do mesmo modo que com *D. composita*, a presença de ANA no meio de cultura não evidenciou diferenças quanto ao número de nós e comprimento do ramo em *D. zingiberensis* (Chen *et al.*, 2003). A partir desses resultados pode-se inferir que a presença de reguladores de crescimento de forma isolada bem como de forma conjunta não interfere no crescimento das plantas de *Dioscorea*, nem tão pouco nas plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*.

A única resposta de incremento dos microtubérculos das plantas dos diferentes somaclones na presença de ANA foi relacionada ao teor de água. Esta resposta está diretamente relacionada a menor massa seca dos mesmos, em relação à massa fresca. Esse regulador não se mostrou favorável para aumentar a massa seca dos microtubérculos, porém o fato de aumentar a percentagem de microtubérculos com massas secas entre 151 mg e 300 mg para os somaclones S2, S4 e S5, maiores que 301 mg para o somaclone S1 e inibir a formação de microtubérculos com massas secas menores que 100 mg, indica que ainda ANA poderia ser utilizado para otimizar a produção de microtubérculos. A constatação de que ótima concentração de ANA, para se obter tais tipos de respostas variou, para cada somaclone, sendo de 5,0 μM para S1 e S2, de 2,5 μM para S4 e S5 e ausência de ANA para S3, deve ser avaliada com precaução, uma vez que para os somaclones S1 e S2 a percentagem de senescência das plantas foi de 33%. Talvez a resposta do ANA de não ocasionar o aumento em massa seca dos microtubérculos possa ser devido ao fato de ter estimulado o crescimento do sistema radicular, pelo menos nos casos dos somaclones S1, S4 e S5. Assim as raízes funcionariam como órgão dreno, devido ao aumento em massa seca, impedindo que houvesse um aumento na massa seca dos microtubérculos.

A complementação do meio de cultura com glutamina foi mais uma alternativa para induzir a formação de microtubérculos e incrementar a parte aérea e o sistema radicular das

plantas dos diferentes somaclones de *D. composita*. Contudo, esta complementação, utilizada com muito sucesso na cultura de tecidos vegetais, estimulando o crescimento (Caldas *et al.*, 1998) não resultou em diferenças no crescimento das plantas dos diferentes somaclones, quando comparadas com as plantas inoculadas em meio de cultura sem glutamina.

Essa resposta pode estar relacionada com a degradação da glutamina e conseqüentemente a produção de um composto inibitório do alongamento do sistema radicular e do crescimento da parte aérea, denominado 5-oxoprolina. De acordo com Pedrotti *et al.* (1994) citando Archibald (1945), a glutamina é instável a pH elevado e a altas temperaturas, tal como a temperatura da autoclave, ocorrendo assim a sua degradação e a produção de 5-oxoprolina. A degradação deste aminoácido foi verificada por Pedrotti *et al.*, (1994) em estudo sobre o efeito da autoclavagem de aminoácidos no enraizamento *in vitro* de *Prunus avium* L. Os mesmos autores verificaram que a massa seca do sistema radicular e da parte aérea foi fortemente reduzida quando as plantas foram inoculadas em meio cuja adição de glutamina foi realizada antes do processo de autoclavagem, comparando-se com os tratamentos onde as plantas foram inoculadas em meio sem a presença desse aminoácido.

A presença do composto inibidor pode ser a causa da diminuição da massa seca do sistema radicular das plantas do somaclone S4 inoculadas na presença de 2,73 mM de glutamina bem como da inibição do crescimento dos microtubérculos, fazendo com que grande percentagem deles permanecessem com massa seca inferior a 100 mg. Entretanto, resultados opostos aos observados no presente trabalho, relacionados ao efeito da fonte de nitrogênio sobre o crescimento, foram obtidos por Tsai & Saunders (1999) estudando beterrabas. Os autores verificaram que o crescimento das plantas de beterraba foi superior na presença de glutamina do que na ausência desta fonte de nitrogênio. Além disso, outras fontes foram testadas, tais como prolina e glutamato, porém diante destas fontes, a resposta das plantas de beterraba não foi positiva. Segundo Pedralli *et al.* (1994), os mecanismos

bioquímicos envolvidos nos efeitos inibitórios do produto da degradação da glutamina são ainda desconhecidos.

4.5. CONCLUSÕES

1. As plantas dos diferentes somaclones crescem e desenvolvem suas partes aéreas e sistemas radiculares bem como produzem microtubérculos na ausência de GA₃, mas nessa condição não são produzidos microtubérculos maiores que 201 mg, exceto para os somaclones S2 e S5.

2. Para os somaclones S1, S2, S3 e S4 a presença de GA₃ ao meio de cultura é necessária para promover a formação de microtubérculos alongados, propiciar a redução da percentagem de formação de microtubérculos menores que 100 mg e o aumento da percentagem de microtubérculos maiores que 201 mg de massa seca. Para o somaclone S5 isto é conseguido na ausência de GA₃.

3. O tempo ótimo de permanência das plantas em meio de cultura contendo GA₃ para a obtenção de microtubérculos com maior massa seca, maior proporção de microtubérculos com massa seca superior a 201 mg e menor proporção de microtubérculos menores é de 15 e 30 dias para os somaclones S1 e 15 dias para o somaclone S4.

4. Diferentes períodos de permanência das plantas dos somaclones em meio contendo GA₃ não influenciam no desenvolvimento da parte aérea dos mesmos, observado pelo menor comprimento do maior ramo.

5. Na presença de 5 µM de GA₃ e ANA, a massa seca dos microtubérculos não é promovida, mas o teor de água dos mesmos aumenta, para todos os somaclones exceto o S2, assim como aumenta a proporção de microtubérculos com massa seca maior e diminui a proporção de microtubérculos menores que 100 mg, exceto para o somaclone S3.

6. A complementação do meio de cultura com ANA, na presença de GA₃, provoca o aumento da massa seca do sistema radicular, exceto para os somaclones S2 e S3, mas não provoca o aumento do desenvolvimento da parte aérea das plantas dos diferentes somaclones.

7. A suplementação do meio de cultura com glutamina não provoca o aumento no crescimento e desenvolvimento da parte aérea, do sistema radicular das plantas e nem dos microtubérculos.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE BIOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE DIOSGENINA DOS SOMACLONES DE *D. composita*

5.1. INTRODUÇÃO

Os tubérculos das plantas de *Dioscorea* têm como principais funções o acúmulo de substâncias de reservas e a propagação, funcionando também como órgãos de resistência a períodos adversos (Ammirato, 1984). Dentre os diversos carboidratos, o amido é o principal composto dos órgãos de reserva (Raven, 2001), correspondendo a 70% da massa seca dos tubérculos de *Dioscorea* (Onwueme, 1978). A síntese do amido inicia-se com a degradação da sacarose, proveniente da fotossíntese ou do meio de cultura, em glucose e frutose, as quais, através de reações mediadas por enzimas, formam os grãos de amido nos amiloplastos. Este amido é armazenado nos tubérculos por longos períodos, apresentando baixa ciclagem, podendo ser rapidamente mobilizado e metabolizado em período de brotação (Avigad & Dey, 1997).

A sacarose, principal produto da fixação do carbono pela fotossíntese, é também o principal carboidrato solúvel dos tubérculos de *Dioscorea*, cuja percentagem pode se apresentar superior a 60% (Ketibu & Oyenuga, 1973), sendo também o principal carboidrato solúvel de 5 espécies nativas do gênero (Chu & Figueiredo-Ribeiro, 1991).

As plantas produzem uma diversidade de compostos que, ao contrário dos carboidratos, não participam diretamente do crescimento e desenvolvimento do vegetal. Tais compostos são conhecidos como metabólitos secundários e possuem diferentes funções para o vegetal, além do interesse econômico por esses compostos, especialmente pela sua grande utilidade como fibras, polímeros, tinturas, condimentos e drogas para a indústria farmacêutica (Croteau *et al.*, 2000). Há muito se sabe que os metabólitos secundários da classe das sapogeninas são compostos possivelmente produzidos pela parte aérea das plantas, utilizados para defesa contra patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 2000) e herbívoros (Francis *et al.*, 2002). Experimentos demonstrando as propriedades fisiológicas, imunológicas e farmacológicas das sapogeninas têm provocado considerado interesse nessas substâncias (Francis *et al.*, 2002). Diosgenina é um metabólito secundário da classe das sapogeninas esteroidais cuja utilização pela indústria farmacêutica deve-se, especialmente, à sua utilidade como fonte alternativa de matéria-prima para a síntese de hormônios esteroidais e corticosteróides (Oashi, 1999).

A diosgenina presente nos extratos vegetais pode ser isolada através da cromatografia. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizado através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. A cromatografia em camada delgada (TLC) consiste na separação dos componentes de uma dada mistura, sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana, através da migração diferencial (Collins & Braga, 1988). Esta técnica foi bastante utilizada para determinação de sapogeninas esteroidais (Hara, 1963; Blunden & Hardman, 1964; Elmunajjed *et al.*, 1965; Brain & Hardman, 1968; Sánchez *et al.*, 1972; Aminuddin & Chowdhury, 1983). De acordo com Sánchez *et al.* (1972), a cromatografia em camada delgada pode ser recomendada para análise rotineira de determinação de diosgenina em *Dioscorea* devido a sua precisão e especialmente à economia e facilidade de operação.

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram a quantificação de açúcares solúveis, de amido e de diosgenina nas plantas dos diferentes somaclones aclimatizados, visando selecionar o melhor somaclone, e nas plantas do somaclone S5 inoculadas em meio de cultura suplementado com ácido giberélico, ácido naftalenoacético e ácido indolbutírico, além da padronização das metodologias de dosagens de açúcares solúveis totais, amido e diosgenina.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Condições de cultivo

Foram utilizados parte aérea e tubérculos de plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* Hemsl mantidas, durante 4 meses, em vasos de 2,5 L, contendo substrato composto de areia e terra, na proporção de 1:1. cobertas com sombrite 50%, sendo regadas, com água potável, uma vez por semana, em casa de vegetação. Microtubérculos e parte aérea das plantas do somaclone S5 inoculadas, durante 5 meses, em meio de cultura MS (Sigma, Co.) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose 2% (p/v), Phytigel® (Sigma, Co.) a 0,2% (p/v) e 5 µM dos reguladores de crescimento ANA, AIB e GA₃, sendo mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada (25°C ± 2°C), sob fotoperíodo de 16 horas fornecido por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, com fluxo de fótons de 22,3 µmol.m⁻².s⁻¹ e umidade relativa de 70% também foram avaliados.

5.2.2. Análise bioquímica de carboidratos solúveis e amido

Tubérculos e microtubérculos foram pesados, colocados em embalagens de papel e mantidos em estufa por pelo menos 48 horas a 85°C até obter-se peso seco constante e pesados novamente, sendo triturados em micromoinho de malha de 0,17 mm. Foram utilizados de 1,0 a 6,0 g de material vegetal em pó para a extração, na proporção de 3 mL de solvente (etanol 80%) para cada 1 g de amostra seca, que foram extraídos durante 15 minutos e centrifugados em 2000g por 10 minutos, com três repetições. Em seguida, as frações sobrenadantes foram reunidas, mensuradas, uma parte reservada para análise de saponinas e outra parte para ser analisada quanto aos carboidratos solúveis. A dosagem bioquímica dos açúcares solúveis foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956, modificado). A leitura de absorbância em espectrofotômetro foi feita a 490 nm, tendo como carboidrato padrão D-glucose e a curva padrão $y = 99,03x + 2,7177$ ($R^2 = 0,9703$).

O precipitado da extração foi seco em aparelho HetoVac VR-I, até peso seco constante, para a extração de amido. Do material seco (0,5 g), o amido foi extraído com o uso do ácido perclórico 52%, a 4°C, por 30 minutos com eventuais agitações (McCready *et al.*, 1950). Após este período, o material foi transferido para tubos de centrífuga fechados e centrifugado a 2300g por 15 minutos, com mais uma repetição da extração com ácido perclórico. Os sobrenadantes foram reunidos, mensurados os volumes finais e estimado-se os teores de amido através da dosagem por carboidrato total (Dubois *et al.*, 1956), multiplicado pelo fator de correção 0,9.

5.2.3. Quantificação de diosgenina

Foram utilizadas amostras dos tubérculos das plantas aclimatizadas com exceção do somaclone S1 que teve também a parte aérea analisada. Para as plantas cultivadas *in vitro*, microtubérculos e parte aérea tiveram seu conteúdo de diosgenina analisado. Amostra de 1 mL do sobrenadante da extração etanólica da análise bioquímica foi utilizada para a quantificação de diosgenina, sendo colocada no HetoVac VR-I para retirada do solvente. A hidrólise das amostras foi realizada em frascos de vidro com 200 µL de HCl 4N, em autoclave a 1,1 Kgf.cm⁻², com temperatura de 121°C, durante 1 hora. Em seguida, foram realizadas as cinco extrações com 2 mL de clorofórmio. As fases orgânicas foram reunidas, o solvente foi removido por evaporação e o extrato foi novamente dissolvido em 200 µL de solução clorofórmio:metanol:etanol 96% (5:4:1).

A análise de cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica-gel GF 200 µm de espessura (20 cm x 20 cm, partículas de 2-25 µm), utilizando o sistema de solvente hexano-etanol absoluto (10:1). O percurso das amostras foi de aproximadamente 15 cm na placa de cromatografia, sendo utilizado reagente de Liebermann-Buchard (Wagner & Bladt, 2001) para a revelação, seguida de aquecimento (110-120°C) durante 5 a 10 minutos. A estimativa bioquímica foi realizada em fotografia digital, com auxílio do equipamento fotográfico Camag Reprostar 3 e câmara digital Epson PhotoPC 3000Z, sob iluminação UV a 366 nm, tendo diosgenina e colesterol como padrão (Barroso *et al.*, 1974; Rishi *et al.*, 1976 modificados) e a curva padrão de diosgenina $y = (0,0072) * x^{2,3759}$ ($R^2 = 0,8781$). As fotografias digitais foram modificadas através do programa Photo Studio 2.0 SE, sendo passadas para efeito negativo, convertidas em escala de cinza com ajuste do contraste para 48 e posteriormente foram analisadas no programa computacional Image Tool 3.0 (University of Texas, Health Science Center, San Antonio – Texas) para a densitometria das manchas

obtidas na revelação e estimativa de teores de substâncias através da triangulação dos resultados obtidos, estimativa da respectiva área e correlação direta com a concentração aplicada de diosgenina.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Análises bioquímicas de carboidratos solúveis e amido

Os resultados sobre a quantificação de açúcares solúveis e amido, nos tubérculos das plantas aclimatizadas dos diferentes somaclone, são mostrados na Tabela 1.

Como se pode observar, a concentração de açúcares solúveis e de amido difere entre as plantas dos somaclones. O somaclone S3 apresentou maior teor dos compostos de reserva (acima de 18 mg.g^{-1} de MS para açúcares solúveis e acima de 16 mg.g^{-1} de MS para amido). Resposta contrária foi observada nos tubérculos dos somaclones S1 ($3,65 \text{ mg.g}^{-1}$ de MS para açúcares solúveis e $3,28 \text{ mg.g}^{-1}$ de MS para amido) e S4 ($3,77 \text{ mg.g}^{-1}$ de MS para açúcares solúveis e $3,39 \text{ mg.g}^{-1}$ de MS para amido), que apresentaram os menores teores desses compostos.

Tabela 1. Teores de alguns compostos de reserva presentes nos tubérculos das plantas dos diferentes somaclones de *Dioscorea composita* produzidos em meio de cultura Murashige & Skoog, na ausência de reguladores de crescimento e aclimatizados em casa de vegetação durante 4 meses. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Somaclones	Açúcares Solúveis (mg.g ⁻¹)		Amido (mg.g ⁻¹)	
	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a
S1	1,35 ± 0,1 c	3,65 ± 0,2 c	1,22 ± 0,1 c	3,28 ± 0,2 c
S2	4,13 ± 0,5 b	12,7 ± 1,5 b	3,72 ± 0,4 b	11,43 ± 1,3 b
S3	5,76 ± 0,2 a	18,24 ± 0,7 a	5,18 ± 0,2 a	16,42 ± 0,6 a
S4	1,43 ± 0,2 c	3,77 ± 0,6 c	1,28 ± 0,2 c	3,39 ± 0,5 c

^a Médias ± desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca; MS= massa seca.

A presença das classes de reguladores de crescimento no meio de cultura influenciou os teores de açúcares solúveis e amido nos microtubérculos do somaclone S5 (Tabela 2) na estimativa em massa seca. As auxinas proporcionaram maior concentração dos compostos de reserva nos microtubérculos das plantas, ao contrário de GA₃.

Tabela 2. Efeito da presença de 5 µM de ANA, AIB e GA₃ sobre os teores de alguns compostos de reserva dos microtubérculos do somaclone S5 de *Dioscorea composita* produzidos a partir do cultivo de plantas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 8% de sacarose, após 5 meses. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Reguladores	Açúcares Solúveis (mg.g ⁻¹)		Amido (mg.g ⁻¹)	
	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a
ANA	7,85 ± 0,9 a	43,89 ± 5,2 a	7,06 ± 0,8 a	39,50 ± 4,7 a
AIB	9,55 ± 0,4 a	46,39 ± 1,8 a	8,59 ± 0,3 a	41,75 ± 1,6 a
GA ₃	9,27 ± 0,7 a	32,56 ± 2,4 b	8,34 ± 0,6 a	29,30 ± 2,1 b

^a Médias ± desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca; MS= massa seca.

5.3.2. Quantificação de diosgenina

A análise da cromatoplaça apresentou vários compostos, sendo nove manchas distintas, diosgenina e colesterol nos tubérculos e na parte aérea das plantas aclimatizadas bem como nos microtubérculos e na parte aérea das plantas do somaclone S5 cultivado *in*

vitro (Tabela 3). O tempo de retenção das substâncias teve diosgenina, a principal sapogenina descrita na literatura, e colesterol, o precursor deste composto secundário, como padrões.

Tabela 3. Distribuição, de acordo com o tempo de retenção em cromatoplaça (placa de sílica-gel GF, 200 μm de espessura, 20 cm x 20 cm, partículas de 2-25 μm) no sistema de solventes hexano-etanol absoluto (10:1), das amostras (30 μL do extrato bruto) de plantas de *Dioscorea composita* aclimatizadas durante 4 meses em casa de vegetação e cultivadas *in vitro* durante 5 meses. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

Substâncias	Tempo de retenção	Aclimatizadas					<i>In vitro</i> – somaclone S5					
		Parte Aérea		Tubérculos			Parte Aérea			Microtubérculos		
		S1	S1	S2	S3	S4	ANA	AIB	GA ₃	ANA	AIB	GA ₃
A	2,64		traço	0,03	0,07	0,01			0,01	0,33	1,43	
B	3,34								0,10	0,33		
C	4,37							0,05	0,02	0,08	1,96	
D	5,73	0,15	0,02	0,72	1,21	0,28	1,02	0,26	0,38	0,58	0,62	0,33
Diosgenina	6,83	0,22	0,02	0,02	0,12	0,07	0,96	0,25	0,27	0,25	0,33	0,51
Colesterol	7,77	0,29	0,02	0,07	0,25	0,05	0,97	0,39	0,80	0,30	0,27	0,27
E	9,54	0,03	0,01		0,06	0,03	0,28	0,02	0,02	0,01	0,02	0,09
F	12,37		0,60	5,74	4,49	1,65	2,83	0,68	0,11	2,85	2,82	1,68
G	13,60	0,13	0,21	4,56	4,10	0,50	1,90	0,44	0,47	1,89	1,76	1,48
H	18,11	0,30	traço		traço	0,01	0,56	0,13	0,54	0,03	0,03	0,17
I	19,28	0,04	0,01	0,03	0,04	0,17	0,89	0,02	0,10	0,07	0,02	0,05
Total de fitoesteróis		1,16	0,89	11,17	10,34	2,77	9,41	2,24	2,82	6,72	9,26	4,58

Valores de área corrigidos pela fórmula da diosgenina e expressos em mg.g^{-1} de massa seca.

Diosgenina e colesterol estiveram presentes em todas as plantas dos diferentes somaclones. Foi observada quantidade máxima de diosgenina na parte aérea das plantas do somaclone S5 inoculadas em meio contendo ANA ($0,96 \text{ mg.g}^{-1}$ MS). Os tubérculos dos somaclones S1 e S2 tiveram o menor teor de diosgenina ($0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ MS, cada). Da mesma maneira, colesterol foi observado em maior teor na parte aérea das plantas de S5 ($0,97 \text{ mg.g}^{-1}$ MS), em meio suplementado com ANA, e em menor teor nos tubérculos do somaclone S1 ($0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ MS). Além dessas substâncias, todas as plantas dos diferentes somaclones aclimatizados ou cultivados *in vitro*, apresentaram outras três substâncias (D, G e I). A substância G, cujo teor máximo ($4,56 \text{ mg.g}^{-1}$ MS) foi observado nos tubérculos das plantas do somaclone S2, esteve presente em quantidade superior (cerca de 220 vezes mais) a quantidade de diosgenina.

De uma maneira geral, a maioria das substâncias detectadas através das placas de TLC pôde ser observada em todos os tubérculos dos somaclones aclimatizados, com exceção do somaclone S2 que não apresentou 4 substâncias (B, C, E e H) das 11 detectadas. Para a parte aérea do somaclone S1, não foram observadas substâncias com menor tempo de retenção (substâncias A, B e C).

As plantas do somaclone S5, cultivadas *in vitro*, apresentaram padrões diferenciados de resposta para as substâncias de menor tempo de retenção, dependendo do regulador de crescimento acrescentado no meio de cultura. Substâncias com tempo de retenção próximo ou superior ao da diosgenina, foram detectadas tanto na parte aérea quanto nos microtubérculos das plantas na presença de todos os reguladores de crescimento.

A estimativa dos teores de diosgenina obtida na revelação das manchas nas placas de TLC e o rendimento, em percentagem de diosgenina, das plantas dos diferentes somaclones aclimatizados e do efeito dos diferentes reguladores de crescimento são mostrados na Tabela 4. A curva padrão, utilizada no cálculo, é mostrada na Figura 1.

Tabela 4. Quantificação de diosgenina presente nas plantas de *Dioscorea composita* aclimatizadas durante 4 meses em casa de vegetação e cultivadas *in vitro* durante 5 meses. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

	Diosgenina (mg.g ⁻¹)				Diosgenina (%)			
	Tubérculo		Parte Aérea		Tubérculo		Parte Aérea	
	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a
Aclimatizadas								
S1	0,008 c	0,021 c	0,056	0,22	0,001	0,002	0,006	0,022
S2	0,005 c	0,015 c	-	-	0	0,002	-	-
S3	0,037 a	0,117 a	-	-	0,004	0,012	-	-
S4	0,026 b	0,069 b	-	-	0,003	0,007	-	-
<i>In vitro</i>	Microtubérculos		Parte Aérea		Microtubérculos		Parte Aérea	
	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a	MF ^a	MS ^a
ANA	0,045 b	0,251 b	0,123 a	0,963 a	0,004	0,025	0,012	0,096
AIB	0,068 b	0,338 ab	0,037 b	0,249 b	0,007	0,033	0,004	0,025
GA ₃	0,146 a	0,512 a	0,051 b	0,272 b	0,015	0,051	0,005	0,027

^a Médias de quatro repetições seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca; MS= massa seca.

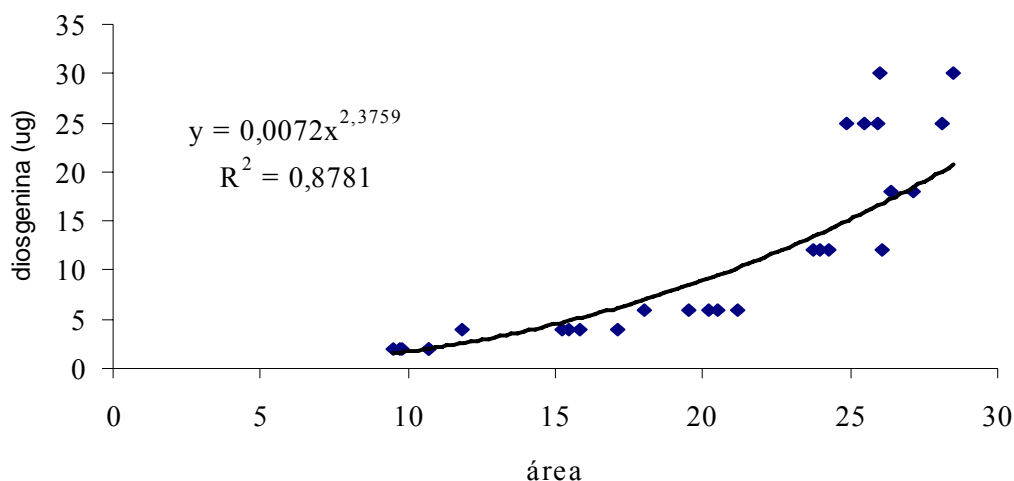


Figura 1. Curva padrão exponencial obtida em placa de TLC relacionando a área de cada mancha com a concentração de diosgenina padrão.

Apenas para o somaclone S1 foi observado o teor de diosgenina também na parte aérea e o resultado mostra um rendimento, em percentagem de diosgenina, de aproximadamente 11 vezes mais diosgenina na parte aérea com relação ao rendimento encontrado nos tubérculos. O somaclone S3 apresentou maior teor de diosgenina nos tubérculos aclimatizados ($0,117 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). Este teor foi cerca de 5,5 vezes maior que os observados nos tubérculos dos somaclones S1 e S2, os quais apresentaram os menores teores de diosgenina ($0,021 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e $0,015 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente).

Não houve uma relação direta entre os reguladores de crescimento e suas classes com seus efeitos sobre o teor de diosgenina das plantas do somaclone S5. As auxinas apresentaram efeito diferente sobre a parte aérea. Apenas na presença de ANA o teor de diosgenina foi maior na parte aérea do que nos microtubérculos. Na presença de GA_3 ocorreu o inverso. O maior teor de diosgenina, nos microtubérculos, foi observado nas plantas inoculadas na presença de GA_3 ($0,146 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). Na presença de ANA e AIB, os microtubérculos de S5 apresentaram teor cerca de 2 vezes menos diosgenina. Para a parte aérea, o maior teor de diosgenina foi proporcionado com ANA no meio de cultura (acima de $0,1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$).

5.4. DISCUSSÃO

As respostas diferenciadas entre os somaclones com relação aos teores dos compostos de reserva presentes nos tubérculos das plantas aclimatizadas e nos microtubérculos do somaclone S5, ao rendimento de diosgenina, tendo S3 apresentado o maior rendimento e à detecção das substâncias através de TLC, podem ser conseqüências da variação somaclonal já observada nos experimentos que precedem o atual.

Além disso, as diferenças nos compostos de reserva podem estar relacionadas com o metabolismo de amido. A síntese e acúmulo de amido são provenientes da degradação da sacarose via sacarose sintase, resultando na formação de frutose e glucose, as quais são convertidas em hexoses fosfato, importadas para os plastídeos, acumulando-se na forma de grãos de amido (Fernie *et al.*, 2001) tanto nas folhas quanto nos tubérculos (amiloplasto). De acordo com Cruz *et al.* (2003), o maior acúmulo de compostos de reserva nos tubérculos pode significar que a assimilação de carbono está excedendo o uso deste, o que deve estar acontecendo nos tubérculos das plantas do somaclone S3. Em contrapartida, pode-se inferir que os somaclones S1 e S4 não apresentam mobilização de sacarose da parte aérea para o tubérculo, possivelmente utilizando o carbono para o seu crescimento, uma vez que há um menor acúmulo de compostos de reservas nos tubérculos.

O menor desenvolvimento da parte aérea das plantas do somaclone S3, em casa de vegetação, também pode estar interferindo nas respostas observadas na Tabela 1. O ambiente da casa de vegetação pode ter sido fator de estresse para as plantas do somaclone S3. Em situações de estresse, as plantas tentam evitar danos alterando o seu metabolismo (Yordanov *et al.*, 2000), e, diante das respostas das plantas deste somaclone à aclimatização em casa de vegetação, estas podem estar alocando energia para sintetizar e acumular compostos de

reserva nos tubérculos, órgão resistente em condições desfavoráveis, no lugar de utilizar o carbono para o desenvolvimento da parte aérea. Chu (1989), estudando *D. delicata*, também observou relação entre o menor desenvolvimento da parte aérea e o maior teor de amido.

O resultado da quantificação de amido no somaclone S3 (5,18 mg.g⁻¹ MF) foi similar ao encontrado por Selvaraj *et al.* (1982), em tubérculos de *D. composita* de 1 ano de idade, cujo teor foi de 4,2 mg.g⁻¹ MF. Além dessa espécie, os autores também quantificaram amido de tubérculos de 1 ano de idade de outras 2 espécies produtoras de sapogeninas, *D. deltoidea* (7,8 mg.g⁻¹ MF) e *D. floribunda* (6,5 mg.g⁻¹ MF), cujos resultados observados também foram semelhantes ao encontrado nos tubérculos do somaclone S3.

Estudos das análises bioquímicas dos compostos de reserva de tubérculos de outras espécies demonstraram grande variação nos teores desses compostos. Martin (1974), estudando *D. bulbifera* observou teor de amido acima de 16% da massa fresca do tubérculo e teor de açúcares solúveis acima de 0,4%. *D. alata* e suas variedades também foram estudadas por Martin (1976) e Bradbury & Holloway (1988), onde os teores de amido variaram de 15,6% a 23,87% da massa fresca dos tubérculos e os teores de açúcares solúveis de 0,5% a 1,39%. *D. trifida* (Martin & Degras, 1978; Bradbury & Holloway, 1988) alternou os teores de amido entre 14,2% e 38% da massa fresca dos tubérculos. Degras (1986) quantificou amido de *D. rotundata*, verificando a presença do composto de reserva em tubérculos com diferentes idades, tendo maior rendimento tubérculos de 6 meses de idade (84% da massa seca). *D. delicata*, *D. olfersiana*, *D. laxiflora*, *D. subhastata* e *D. sanpaulensis* (Chu, 1989) demonstraram variação nos teores dos compostos de reserva. O maior teor de açúcares solúveis (acima de 27% da massa seca do tubérculo) e de amido (49,5%) foi observado em *D. laxiflora*. Entretanto, em *D. delicata* foi quantificado o menor teor de açúcares solúveis (11,24% da massa seca do tubérculo) e em *D. olfersiana* o menor teor de amido (3,52%).

Os resultados obtidos para *D. composita* foram inferiores quando comparados com as espécies supracitadas. Esse resultado pode estar relacionado com o ciclo de vida das plantas do gênero *Dioscorea* e também com as condições de aclimatização. Plantas do gênero *Dioscorea* possuem um ciclo de crescimento anual, onde as espécies utilizadas comercialmente são caracterizadas pela formação de um novo tubérculo a cada ciclo de desenvolvimento enquanto que as espécies produtoras de sapogeninas apresentam crescimento contínuo de seus tubérculos (Chu & Figueiredo-Ribeiro, 1991), tornando-se cada vez mais lignificados e ricos em metabólitos secundários, enquanto que a parte aérea é renovada anualmente. O curto tempo que os somaclones permaneceram em casa de vegetação pode ter sido o fator do baixo desenvolvimento dos tubérculos e, conseqüentemente, a baixa acumulação de compostos de reserva. Além disso, a baixa intensidade luminosa da sala de crescimento e da casa de vegetação podem ter acarretado nos resultados obtidos, já que as espécies comerciais são cultivadas a pleno sol com o auxílio de tutores.

Kouassi *et al.*, (1990) analisaram os açúcares solúveis presentes em tubérculos de *D. esculenta* após período de estocagem e verificaram aumento no conteúdo de sacarose de 56% em tubérculos estocados durante 1 mês. Os autores relacionam este aumento com estudos enzimáticos que mostram a atividade de amilases ocorrendo em tubérculos estocados de *Dioscorea*.

Para as plantas do somaclone S5 cultivadas *in vitro*, os teores dos compostos de reserva dos microtubérculos indicam a ocorrência de variações desses compostos de acordo com o regulador de crescimento utilizado no meio de cultura. Os teores de açúcares solúveis e amido, nos microtubérculos, podem estar embasados em algumas características dos reguladores de crescimento sobre o desenvolvimento vegetal e também relacionados com as respostas do crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plantas desse somaclone.

As características das auxinas em promover a formação de raízes laterais e adventícias (Taiz & Zeiger, 2004) juntamente com a maior massa seca das raízes observada nas plantas de S5 quando na presença de ANA e AIB, podem ter favorecido as plantas na melhor absorção dos constituintes do meio de cultura, inclusive da sacarose, fonte de carbono disponível no meio e, conseqüentemente, na utilização deste açúcar para a formação e acúmulo dos compostos de reserva nos microtubérculos.

Em contrapartida, a presença de GA₃, no meio de cultura, não incrementou eficientemente a formação de raízes nas plantas do somaclone S5, o que pode ter acarretado deficiência na absorção de sacarose do meio de cultura para utilização na síntese de amido nos microtubérculos. Além disso, as plantas de S5 podem estar utilizando os produtos da fotossíntese para seu desenvolvimento ao invés de acumulá-los nos tubérculos.

Uma das características fisiológicas das giberelinas também pode ter influenciado a resposta de menor teor de compostos de reservas nos microtubérculos. As giberelinas, especialmente GA₃, promovem a produção e também a secreção de inúmeras enzimas hidrolíticas envolvidas na solubilização de compostos de reserva e atuam induzindo a expressão do gene da α - e β -amilase, enzimas hidrolíticas que têm função de degradação do amido em algumas sementes (Taiz & Zeiger, 2004). Entretanto, Selvaraj *et al.* (1982) observaram que a atividade da enzima β -amilase foi maior nos tubérculos armazenados para posterior comercialização das espécies de *Dioscorea* produtoras de sapogeninas, inclusive em *D. composita*, as quais acumularam menor teor de amido. Esta atividade enzimática também pode estar ocorrendo nos tubérculos do somaclone S5 inoculado na presença de GA₃.

A cromatografia em camada delgada é um método de separação, identificação e quantificação de compostos químicos. A utilização da placa de sílica-gel GF deve-se principalmente porque a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos, tais como a diosgenina e os demais esteróides presentes nas plantas de *D. composita*. O tempo de

retenção, ou seja, o tempo que os componentes das amostras ficam adsorvidos no sistema cromatográfico com um fluxo contínuo de um determinado sistema de solventes é uma medida de distância, usada para fins qualitativos, que serve para fracionar e identificar as substâncias contidas nas amostras.

Para o presente trabalho, as únicas substâncias identificadas, através da densitometria das manchas obtidas na revelação das placas de TLC, foram colesterol e diosgenina, as quais foram aplicadas como padrões. Entretanto, apenas diosgenina foi quantificada nos tubérculos e na parte aérea das plantas aclimatizadas e das cultivadas *in vitro*, pois é descrita como a principal sapogenina esteroideal acumulada no tubérculo desta espécie. As diferenças individuais, encontradas no conteúdo de diosgenina dos tubérculos dos somaclones aclimatizados, refletem uma certa variabilidade dentro das plantas clonadas. Edwards *et al.* (2002) também mencionam variação no conteúdo de diosgenina dentro de uma população de *D. villosa* e, assim como Blunden *et al.* (1968), citam que esta variação é esperada para metabólitos secundários caso as plantas sejam cultivadas em diferentes condições ambientais. Além disso, outros fatores, tais como idade e estágio de desenvolvimento das plantas, também influenciam na variação da quantidade de diosgenina e na aparição das sapogeninas esteroidais (Preston, *et al.*, 1964; Blunden *et al.*, 1968; Akahori, *et al.*, 1969).

Estudos de Zullo *et al.* (1987) sobre a extração e quantificação de diosgenina de *D. composita* e *D. floribunda* também mostram que os teores de diosgenina são significativamente dependentes do clone e da idade do cultivo. Esta variação, entre os clones de uma mesma espécie, foi observada com as plantas aclimatizadas dos diferentes somaclones de *D. composita*, tendo o somaclone S3 o maior teor de diosgenina nos tubérculos quando comparado com os demais somaclones. De acordo com Purseglove (1972), a exploração comercial de diosgenina exige teores de, pelo menos, 3% da massa seca do tubérculo, o que não foi observado nas plantas aclimatizadas. Zullo *et al.* (1987) observaram teor médio de

diosgenina de 1% da massa seca dos tubérculos de *D. composita* aos 12 meses de plantio até cerca de 3% aos 72 meses de plantio, destacando que os teores de diosgenina mostram-se crescentes com a idade do cultivo, tendendo a um limite quando a cultura se torna perene e apresentando um máximo ao redor dos 36 meses de cultivo. Estas observações podem justificar o baixo rendimento de diosgenina nos tubérculos das plantas aclimatizadas, já que a quantificação foi feita após 4 meses de plantio em condições de casa de vegetação, com baixa luminosidade imposta também pelo sombrite 50%, em vasos com capacidade de 2,5 L, contendo substrato composto de areia e terra, na proporção de 1:1.

Devido ao fato do tubérculo ser a parte da planta usada comercialmente, pouco tem sido estudado sobre os compostos esteroidais da parte aérea de *Dioscorea*. Blunden *et al.* (1968) quantificaram constituintes esteroidais da parte aérea de várias espécies de *Dioscorea* de grande potencial econômico, entre elas *D. composita*, pelo método de TLC, detectando diosgenina nas folhas e nos caules de todas as espécies estudadas. *D. composita* apresentou rendimento de diosgenina de 0,28% da massa seca das folhas e 0,01% da massa seca dos caules. No presente trabalho, folhas e pecíolos não foram separados do caule, e o rendimento total de diosgenina observado na parte aérea foi de 0,022%, valor este cerca de 13 vezes menor que o encontrado por Blunden *et al.* (1968). Contudo, este valor é semelhante ao valor encontrado por Datta & Datta (1984) em folhas de *D. composita*, cujo rendimento foi de 0,030%. A variação no conteúdo de diosgenina na parte aérea de *Dioscorea* também foi estudada por Akahori *et al.* (1969) em *D. tokoro*. Entretanto, embora a presença de diosgenina tenha sido detectada, por TLC, a quantidade foi tão mínima, na parte aérea de *D. tokoro*, que uma estimativa da concentração foi impossível de ser feita. O maior teor de diosgenina encontrado na parte aérea (0,22 mg.g⁻¹ da massa seca) das plantas do somaclone S1, em relação aos teores encontrados no tubérculo (0,021 mg.g⁻¹ da massa seca), pode ser explicado

pelo fato de que a diosgenina é sintetizada possivelmente na parte aérea e posteriormente transportada para os tubérculos.

Assim como no teor dos compostos de reserva dos microtubérculos, os resultados obtidos na quantificação de diosgenina nas plantas do somaclone S5, na presença de diferentes reguladores de crescimento, pode ser devido às características específicas de cada regulador e o efeito desses sobre o crescimento de *D. composita*. As giberelinas possuem característica de retardar a senescência foliar. Se as folhas ficam viáveis por um longo período de tempo, isso implica numa maior produção de fotoassimilados, de produtos de reserva e de sapogeninas, o que pode ter resultado no maior rendimento de diosgenina observado nos microtubérculos das plantas de S5 quando na presença de GA₃.

Em contra partida, o efeito de ANA sobre o crescimento da parte aérea das plantas de S5, proporcionando maior massa seca, aliado ao local de síntese de diosgenina, sugere que o maior rendimento de diosgenina, observado na parte aérea das plantas inoculadas em meio de cultura contendo ANA, tenha sido acarretado pelo maior desenvolvimento da planta, evidenciado pela maior massa seca. Entretanto, mesmo a massa seca da parte aérea das plantas inoculadas com AIB não tendo diferido das inoculadas com ANA, o teor de diosgenina nas plantas com AIB foi o menor observado. Conforme Blunden *et al.* (1968), a falta de compostos pode ser devido a ausência de sistemas enzimáticos ou ausência de precursores necessários para a biossíntese do composto.

O efeito da presença de auxina no meio de cultura, para quantificação de diosgenina, também foi observado por Chaturvedi & Chowdhury (1980) em calos de *D. deltoidea* originados de tubérculos, onde o maior rendimento (1,6%) foi observado quando utilizado AIA e 2,4-D. Os autores citam a importância do sinergismo entre essas duas auxinas para a síntese de diosgenina. Aminuddin & Chowdhury (1983) também verificaram o rendimento de diosgenina em calos originados de tubérculos de *D. floribunda*, na presença da auxina 2,4-D,

cujo rendimento alcançou 1,1% de diosgenina da massa seca dos calos. Narula *et al.* (2003) observaram que a utilização de AIA, juntamente com cinetina, proporcionou maior teor de diosgenina em plantas de *D. bulbifera* (12,3 mg.g⁻¹ massa seca do tubérculo). Os autores salientam que a espécie, pouco explorada como fonte de diosgenina, pode ser usada para obter elevados níveis desse metabólito secundário.

Diante dos resultados obtidos para *D. composita* e considerando-a produtora potencial de diosgenina, maiores estudos relacionados às análises bioquímicas e quantificação de diosgenina em plantas completas devem ser efetuados, visto que há carência de informação quando se compara com os estudos realizados com cultura de células. Além disso, experimentos em longo prazo devem ser realizados, já que dados de rendimento confiáveis são obtidos somente após 3 a 5 anos de crescimento da planta.

5.5. CONCLUSÕES

1. As características individuais dos somaclones influenciam os teores dos compostos de reserva, das plantas aclimatizadas em casa de vegetação, indicando uma possível existência de variação somaclonal.

2. Diosgenina é sintetizada em todos os somaclones aclimatizados, sendo o somaclone S3 o que apresenta maior teor deste metabólito secundário nos tubérculos, porém em quantidade insuficiente para produção comercial, recomendando-se uma otimização de pelo menos 10 vezes, aproximando-se de 1% da massa seca já obtido de outras espécies em

culturas de células em suspensão e o prolongamento, em maior período de tempo, do cultivo em casa de vegetação.

3. Os microtubérculos das plantas do somaclone S5, cultivadas *in vitro* em meio de cultura suplementado com diferentes reguladores de crescimento, apresentam diferenças nos teores dos compostos de reserva. As características inerentes às auxinas combinadas com os resultados de crescimento *in vitro* observados durante a permanência das plantas em meio de cultivo suplementado com ANA e AIB acarretam a promoção de maior teor de amido e açúcares solúveis nos microtubérculos.

4. Os teores de diosgenina na parte aérea e nos microtubérculos das plantas de S5, cultivadas *in vitro*, diferem em resposta ao regulador de crescimento utilizado. Para maior acúmulo de diosgenina nos microtubérculos recomenda-se a presença de GA₃, em contra partida, o teor de diosgenina na parte aérea é maior na presença de ANA.

5. A metodologia de dosagem de diosgenina, nesse estudo preliminar, e a curva padrão obtida com diosgenina, mostram-se eficientes e aplicáveis para a identificação e quantificação desse composto na parte aérea, nos tubérculos e nos microtubérculos das plantas aclimatizadas dos diferentes somaclones e do S5 cultivado *in vitro*. Estudos posteriores, com identificação dos demais compostos esteroidais presentes nas plantas aclimatizadas e cultivadas *in vitro*, são sugeridos para abranger todos os metabólitos secundários presentes nas estruturas supracitadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente trabalho abrem novas perspectivas para a viabilização da obtenção de plantas de *Dioscorea composita* cultivadas *in vitro* e para a identificação e quantificação de diosgenina.

As plantas dos diferentes somaclones de *D. composita* apresentam grande capacidade de morfogênese e crescimento *in vitro* em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento, sendo aclimatizadas com sucesso. Entretanto, o uso de diferentes reguladores de crescimento e as variadas combinações realizadas entre os mesmos, proporcionam uma maior taxa de multiplicação, o que implica em uma considerável redução de tempo necessário para a multiplicação das plantas e favorece a transferência das mesmas, em um período curto de tempo, para a casa de vegetação. Outro ponto favorável da utilização de diferentes reguladores de crescimento no meio de cultivo é a maior proporção de microtubérculos com maior massa seca. Além desse fato viabilizar a cultura de tecidos, já que os microtubérculos são considerados fontes de propagação, também favorece a quantificação de diosgenina, pois esse metabólito secundário é sintetizado nas folhas e acumulado nos microtubérculos de *D. composita*.

A análise bioquímica dos compostos de reserva dos microtubérculos das plantas cultivadas *in vitro* e dos tubérculos das plantas aclimatizadas mostra variação entre os somaclones de *D. composita*. Contudo, essa variação está diretamente relacionada com os resultados obtidos no crescimento *in vitro* dos somaclones. Já com relação à quantificação de diosgenina, o teor desse metabólito, nos microtubérculos e tubérculos, é inferior ao referido na literatura. Porém, as metodologias de identificação e dosagem de diosgenina apresentam-se eficientes e aplicáveis.

Estudos posteriores, com identificação dos demais compostos esteroidais presentes nas plantas dos diferentes somaclones de *D. composita* são sugeridos, além disso, estudos a longo prazo devem ser realizados. Isso favoreceria o melhor entendimento da síntese e acumulação de diosgenina em microtubérculos de plantas cultivadas *in vitro* e colocaria a cultura de tecidos como uma ferramenta para a obtenção desse metabólito secundário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAHORI, A.; YASUDA, F.; TOGAMI, M.; KAGAWA, K. & OKANISHI, T. Variation in isodiotigenin and diosgenin content in aerial parts of *Dioscorea tokoro*. **Phytochemistry**, **8**: 2213-2217, 1969.
- ALIZADEH, S., MANTELL, S. H. & VIANA, A. M. In vitro shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **53**: 107-112, 1998.
- AMINUDDIN & CHOWDHURY, A. R. Production of diosgenin in somatic callus tissues of *Dioscorea floribunda*. **Planta Medica**, **48**: 92-93, 1983.
- AMMIRATO, P. V. Yams. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, N. R. & YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**: Crop species. Vol. 3. New York: MACMILLAN, 1984. p. 327-354.
- ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Chapman & Hall, 331 p. 1996.
- AVIGAD, G. & DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M. & HARBONE, J. B. **Plant Biochemistry**. San Diego and London: Academic Press, 554 p., 1997.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; CANTOS, M.; TRONCOSO, A. & BAREA, J. M. Benefecial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. **Scientia Horticulturae**, **72**: 63-71, 1997.
- BARROSO, G. M., J. B. SILVA, D. SUCRE, E. F. GUIMARÃES, L. F. CARVALHO, F. R. ROSENTHAL, A. N. ROSEIRA, O. M. BARTH & A. F. BARBOSA. Flora Guanabara. Família Dioscoreaceae. **Sellowia**, **25**: 9-256, 1974.
- BLUNDEN, G. & HARDMAN, R. Thin-layer chromatography of *Dioscorea* sapogenins. **Journal Chromatography**, **15**: 273-276, 1964.
- BLUNDEN, G.; BRIGGS, C. J. & HARDMAN, R. Steroidal constituents of the aerial parts of *Dioscorea* e *Tamus* species. **Phytochemistry**, **7**: 453-458, 1968.
- BORGES, M.; CEIRO, W.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J.; INFANTE, Z. & FONSECA, M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **76**: 87-90, 2004.

- BOUMAN, H. & DE KLERK, G. J. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions: Comparison of three assays. **Theoretical and Applied Genetics**, **102**: 111-117, 2001.
- BRADBURY, J. H. & HOLLOWAY, W. D. **Chemistry of tropical root crops**. Canaberra: Australian Centre for International Research, 1988, 281p.
- BRAIN, K. R. & HARDMAN, R. An improved method of densitometric thin-layer chromatography as applied to the determination of sapogenin in *Dioscorea* tubers. **Journal of Chromatography**, **38**: 355-363, 1968.
- BRENAC, P. & SAUVAIRE, Y. Accumulation of sterols and steroidal sapogenins in developing fenugreek pods: possible biosynthesis in situ. **Phytochemistry**, **29(2)**: 415-422, 1996.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & PEREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq. v. 1. p. 87-132, 1998.
- CÁNOVAS, F. M.; CANTÓN, F. R.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, A.; GALLARDO, F. & CRESPILO, R. Molecular physiology of glutamine and glutamate biosynthesis in developing seedlings of conifers. **Physiologia Plantarum**, **103**: 287-294, 1998.
- CAZÉ FILHO, J. Clonagem do Inhame (*Dioscorea* sp.) por Métodos Biotecnológicos. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 1., 2002, João Pessoa, PB. **Anais...João Pessoa, PB: EMEPA – PB, 2002. v.1, p. 113-123.**
- CHARLWOOD, B. V.; CHARLWOOD, K. A. & MOLINA-TORRES, J. Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. In CHARLWOOD, B. V. & RHODES, M. J. C. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: CLARENDON PRESS, p. 167-200, 1990.
- CHATURVEDI, H. C. & CHOWDHURY, A. R. Effect of growth hormones and some nitrogen sources on diosgenin biosynthesis by tuber-callus of *Dioscorea deltoidea*. **Indian Journal of Experimental Biology**, **18(8)**: 913-915, 1980.
- CHEN, Y.; FAN, J.; YI, F.; LUO, Z. & FU, Y. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **73**: 75–80, 2003.
- CHU, E. P. **Composição bioquímica de órgãos subterrâneos de reserva de espécies nativas de *Dioscorea* e análise do desenvolvimento de *Dioscorea delicata* R. Knuth**. 1989. 178 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

- CHU, E. P. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brazil. **Economic Botany**, **45**(4): 467-479. 1991.
- CHU, E. P. **Cultivo *in vitro*, composição de carboidratos solúveis e isoperoxidasas em espécies de *Dioscorea***. 1998. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências na área de Botânica) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHU, E. P. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **70**: 241-249, 2002.
- COELHO, R. S. B. Resistência Genética a Doenças na Cultura do Inhame (*Dioscorea* spp.). In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA – PB, 2002. v.2, p. 112-114.
- COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3 ed. Campinas: UNICAMP, 298 p., 1988.
- CONABIO. Disponível em <<http://www.conabio.gob.mx>>. Acesso em 14 jul. 2004.
- COSTA, A. M. M. Fisiologia da Aclimatização. In: TOMBOLATO, A. F. C. & COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas, Instituto Agrônômico, 1998, p. 63-67.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M. & LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, Maryland. 1367 p., 2000.
- CRUZ, J. L.; MOSQUIN, P. R.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. & DaMATTA, F. M. Carbon partitioning and assimilation as affected by nitrogen deficiency in cassava. **Photosynthetica**, **41**(2): 201-207, 2003.
- DAHLGREN, R. M. T. & CLIFFORD, H. T. **The monocotyledons. A comparative study**. Orlando: Academic Press Inc. 1982. 378 p.
- DATTA, S. K. & DATTA, K. Chemodifferentiation of diosgenin in *Dioscorea composita*. **Phytochemistry**, **23**(11): 2684-2685, 1984.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2 ed. Academic Publishers, Netherlands. 831 p. 1995.
- DEGRAS, L. **L'Igname. Plante a Tubercule Tropicale**. Techniques Agricoles et Productions Tropicales XXXVI, Paris: G. P. Maisonneuve et Larose, 1986, 408p.

- DE LA CRUZ, G.; LABRADA, M. & RODRÍGUEZ, O. Metodología de micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.) **Informe Técnico**. p. 6. IIA “Jorge Dimitrov”. Granma, ACC. 1992.
- DRAPEAU, D., SAUVAIRE, Y., BLANCH, H. W., & WILKE, C. R. Improvement of diosgenin yield from *Dioscorea deltoidea* Plant Cell Cultures by Use of Non-Traditional Hydrolysis Method. **Planta Medica**, 474-478, 1986.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBES, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, **28**: 350-356, 1956.
- EDWARDS, A. L., JENKINS, R. L. & DAVENPORT, L. J. Presence of diosgenin in *Dioscorea batatas* (Dioscoreaceae). **Economic Botany**, **56**(2): 204-206, 2002.
- ELMUNAJJED, D. T.; FAYEZ, M. B. E. & RADWAN, A. S. Steroid sapogenins: thin-layer chromatography. **Phytochemistry**, **4**: 587-592, 1965.
- ESTRADA-LUNA, A. A.; DAVIES JR, F. T. & EGILLA, J. N. Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and pos-acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **66**: 17-24, 2001.
- FARRAR, J., POLLOCK, C. & GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, **154**: 1-11, 2000.
- FERNIE, A. R.; ROESSNER, U. & GEIGENBERGER, P. The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. **Plant Physiology**, **125**: 1967-1977, 2001.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; CHU, E. P. & ALMEIDA, V. P. Tuberização. **In: KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, p. 409-430.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S. & BECKER, K. The biological action of saponins in animal system: a review. **British Journal of Nutrition**, **88**: 587-605, 2002.
- FURMANOWA, M. & GUZEWSKA, J. *Dioscorea*: In vitro culture and the micropropagation of diosgenin-containing species. p. 161-184. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants II**. vol. 7. Berlim: Springer-Verlag, 545 p., 1989.
- GOMEZ, K. A. & GOMEZ, A. A. **Statistical procedures for agricultural research**. 2 ed. Canada: WILEY, 1984. 680 p.

- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. p. 183-260. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. vol. 1. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 510 p., 1998.
- HAMMOND-KOSACK, K. & JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, Maryland. 1367 p., 2000.
- HARA, S. Analysis of steroid sapogenin by thin-layer chromatography. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, **11**: 1189-1192, 1963.
- HEBLE, M. R. & STABA, E. J. Diosgenin synthesis in shoot cultures of *Dioscorea composita*. **Planta Medica**, p. 120-123, 1980.
- HOU, W. C., HSU, F. L., LEE, M. H. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. **Planta Medica**, **68**: 1072-1076, 2002.
- HU, K., DONG, A. J., YAO, X. S., KOBAYASHI, H., IWASAKI, S. A furostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea colletii* var *hypoglauca*. **Phytochemistry**, **44(7)**: 1339-1342, 1997.
- HU, K. & YAO, X. Protodioscin (NSC – 698 796): Its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. **Planta Medica**, **68**: 297-301, 2002.
- ITHARAT, A., HOUGHTON, P. J., ENO-AMOOQUAYE, E., BURKE, P. J., SAMPSON, J. H. & RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, **90**: 33-38, 2004.
- JAIN, S. M. Mechanisms of spontaneous and induced mutations in plants. **Radiation Review**, **2**: 255-258, 2000.
- JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, **118**: 153-166, 2001.
- JASIK, J. & MANTELL, S. H. Effects of jasmonic acid and its methylester on in vitro microtuberization of three food yam (*Dioscorea*) species. **Plant Cell Reports**, **19**: 863-867, 2000.
- JEAN, M. & CAPPADOCIA, M. In vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. “Brazo Forte” and “Florido” and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **26**: 147-152, 1991.
- JOHN, J. L., COURTNEY, W. H. & DECOTEAU, D. R. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **34**: 245-252, 1993.

- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. Ed. 12. São Paulo: COMPANHIA EDITORA NACIONAL, 1998.
- KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V. & SCHÄFER, C. Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. **Plant Science**, **161**: 695-701, 2001.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. p. 519-531. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. vol. 2. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 345 p., 1999.
- KETIBU, A. O. & OYENUGA, V. A. Changes in carbohydrate constituents of yam tuber (*Dioscorea rotundata* Poir.) during growth. **Journal Science Food Agriculture**, **24**: 367-373, 1973.
- KOHMURA, H.; ARAKI, H. & IMOTO, M. Micropropagation of “yamatoimo” Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immatures leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **40**: 271-276, 1995.
- KOUASSI B.; DIPOH, J. & FOURNET, B. Soluble sugars from yam and changes during tuber storage. **Phytochemistry**, **29**: 1069-1072, 1990.
- LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S. & PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. New York: SPRINGER-VERLAG, 1998. 540 p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000. 531 p.
- LARKIN, P. J. & SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, **60**: 197-214, 1981.
- LAUZER, D., LAUBLIN, G., VINCENT, G. & CAPPADOCIA, M. In vitro propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hock. and *D. mangelotiana* Miège. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **28**: 215–223, 1992.
- LENINGHER, A. L. **Princípios da Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 2000.
- MALMBERG, R.; MESSING, J. & SUSSEX, I. **Molecular Biology of Plants**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 150 p. 1985.
- MANTELL, S. H. & HUGO, S. A. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **16**: 23–37, 1989.

- MARCOTRIGIANO, M. Chimeras and Variegation: Patterns of Deceit. **HortScience**, **32**(5): 773-784, 1997.
- MARTIN, F. W. Tropical yams and their potential. Part 2. *Dioscorea bulbifera*. **USDA Agriculture Handbook**. 466 p, 1974
- MARTIN, F. W. Selected yam varieties for the tropics. In: COCKE, J.; MACINTIRE, R. & GRAHAM, M. **Proceedings of the fourth symposium of the international society for tropical root crops**. 278 p, 1976.
- MARTIN, F. W. & DEGRAS, L. Tropical yams and their potential. Part 5. *Dioscorea trifida*. **USDA Agriculture Handbook**, 522 p., 1978.
- MASTERSON, J. Stomatal size in fossilplants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, **264**: 421-424, 1994.
- McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, S. & OWENS, H. G. Determination of starch and amylase in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry**, **22**(9): 1156-1158, 1950.
- MIYZAWA, M.; SHIMAMURA, H.; NAKAMURA, S. & KAMEOKA, H. Antimutagenic activity of (+)- β -eudesmol and paenol from *Dioscorea japonica*. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, **44**: 1647-1650, 1996.
- MUCHOW, R. C. & SINCLAIR, T. R. Epidermal conductance, stomatal density and stomatal size among genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant, Cell and Environment**, **12**: 425-431, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, **15**: 473-497, 1962.
- NARULA, A.; KUMAR, S.; BANSAL, K. C. & SRIVASTAVA, P. S. In vitro micropropagation, differentiation of aerial bulbils and tubers and diosgenin content in *Dioscorea bulbifera*. **Planta Medica**, **69**: 778-779, 2003.
- NG, S. Y. C. In vitro tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **14**: 121-128, 1988.
- NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N. & VIANA, A. M. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **70**(1): 259-268, 2002.

- OASHI, M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba**. 1999. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em <<http://eps.ufsc.br/teses99/oashi>>. Acesso em: 14 jul. 2004.
- OLSZEWSKI, N.; SUN, T. & GLUBER, F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathway. **The Plant Cell, supplement**: 61-80, 2002.
- ONWUEME, I. C. Influence of storage time on earliness of sprouting and tuberizing in *Dioscorea rotundata* yams. **Journal Agriculture Science**, **84**: 503-505, 1978.
- PEDRALLI, G. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 1., 2002a, João Pessoa, PB. **Anais...**João Pessoa, PB: EMEPA – PB, 2002a. v.1, p. 309-312.
- PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: Aspectos taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002b, João Pessoa, PB. **Anais...**João Pessoa, PB: EMEPA – PB, 2002b. v.2, p. 39-53.
- PEDRALLI, G. **Flora Ilustrada Catarinense: Dioscoreaceas**. Itajaí, SC, 2004. 84p.
- PEDROTTI, E. L.; JAY-ALLEMAND, C.; DOUMAS, P. & CORNU, D. Effect of autoclaving amino acids on in vitro rooting response of wild cherry shoot. **Scientia Horticulturae**, **57**: 89-98, 1994.
- PHILLIPSON, J. D. Plants as sources of valuable products. In: **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: CLARENDON PRESS, p. 1-21, 1990.
- PRESTON, W. H.; HAUN, J. R.; GARVIN, J. W. & DAUM, R. J. Several aspects of growth, development and sapogenin yield of tubers of *Dioscorea spiculiflora*. **Economic Botany**, **18**(4): 323-328, 1964.
- PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops: monocotyledons**, New York: John Wiley & Sons, 1972. 130 p.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.
- READ, P. E. & FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulture**, **166**: 15-20, 1985.

- RISHI, A. K.; KAPOOR, R. & VAKHLU, V. K. A rapid spectrophotometric method for the quantitative determination of diosgenin in *Dioscorea* tuber. **Current Science**, **45(9)**: 327-328, 1976.
- RIZZINI, C. T. & MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2 ed. Revisada e Atualizada. Rio de Janeiro: ÂMBITO CULTURAL, 1995. 248p.
- ROMERO-ARANDA, R.; CANTO-GARAY, R. & MARTINEZ, P. F. Distribution and density of stomata in two cultivars of *Gerbera jamesonii* and its relation to leaf conductance. **Scientia Horticulturae**, **58**: 167-173, 1994.
- SÁNCHEZ, G. L.; ACEVEDO, J. C. M. & SOTO, R. R. Spectrophotometric determination of diosgenin in *Dioscorea composita* following thin-layer chromatography. **Analyst**, **97**: 973-976, 1972.
- SCHOENE, G. & YEAGER, T. Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **83**: 271-277, 2005.
- SCRAGG, A. H. Secondary products from cultured cells and organs: II. Large scale culture. In DIXON, R. A. & GONZALES, R. A. **Plant Cell Culture: A practical approach**. 2nd ed. Oklahoma: IRL Press, 1994. 230 p.
- SELVARAJ, Y.; CHANDER, M. S.; BAMMI, R. K. & RANDHAWA, G. S. Comparative study of the chemical constituents of edible and saponin bearing *Dioscorea* tubers. **Indian Journal of Horticulture**, **198**: 78-83, 1982.
- SENGUPTA, J.; MITRA, G. C. & SHARMA, A. K. Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **3**: 325-331, 1984.
- SICURARI, M.; PICCIONI, E. & STANDARDI, A. Micropropagation and preparation of synthetic seed in M.26 apple rootstock I: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **66**: 207-216, 2001.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1969. **Biometry**. San Francisco, Freeman and Company. 776p
- STAFFORD, A. Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In STAFFORD, A. & WARREN, G. **Plant Cell and Tissue Culture**. England: WILEY, 1991. p. 124-162.
- STAFFORD, A. & WARREN, G. **Plant Cell and Tissue Culture**. England: WILEY, 1991. 251 p.
- SUPLEMENTOS ON LINE: Disponível em:

<<http://www.suplementosonline.com.br/produtos>>. Acesso em 14 jul. 2004.

SUTTER, E. Morphological, Physical and Chemical Characteristics of Epicuticular Wax on Ornamental Plants Regenerated in vitro. **Annals of Botany**, **55**: 321-329, 1985.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

TAL, B., GRESSEL, J. & GOLDBERG, I. The Effect of Medium Constituents on Growth and Diosgenin Production by *Dioscorea deltoidea* Cells Grown in Batch Cultures. **Planta Medica**, **44**: 111-115, 1982.

TAL, B.; ROKEM, J. S. & GOLDBERG, I. Timing of Diosgenin Appearance in Suspension Cultures of *Dioscorea deltoidea*. **Planta Medica**, p. 239-241, 1984.

TOMBOLATO, A. F. C. & COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas, Instituto Agrônomo, 1998, 72 p.

TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília : EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v. 1, 509 p, 1998.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G. de.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M. & ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 2000. 128 p.

TSAI, C. & SAUNDERS, J. W. Evaluation of sole nitrogen sources for shoot and leaf disc cultures of sugarbeet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **59**: 47-56, 1999.

TWYFORD, C. T. & MANTELL, S. H. Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the Greater Yam. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **46**: 17-26, 1996.

VAN HUYLENBROECK, J. M. & DEBERGH, P. C. Monitoring quality of micropropagated plants during acclimatization. **Acta Horticulture**, **517**: 65-72, 2000.

VERSPÖHL, E. J. Recommended testing in diabetes research. **Planta Medica**, **68**: 581 – 590, 2002.

VIANA, A. M. **Crescimento e Reprodução de *Dioscorea composita***. 1985. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VIANA, A. M. & MANTELL, S. H. Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl. and *D. cayenensis* Lam. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **16**: 113-122, 1989.

- VREUGDENHIL, D.; BOOGAARD, Y.; VISSER, R. G. F. & BRUJIN, S. M. Comparison of tuber and shoot formation from in vitro cultured potato explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **53**: 197-204, 1998.
- WEBERLING, F. & SCHWANTES, H.O. **Taxonomia Vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 314 p.
- WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**, 2nd. edition, Berlin: Springer-Verlag, 384pp, 2001.
- YAMAMOTO, M. M., KAWANO, T.; YOUNG, M. C. M., CHU, E. P., HARAGUCHI, M., HIROKI, K. Molluscicidal activity of three Brazilian plants species. **Fitoterapia**, **LXVII (1)**: 59-62, 1996.
- YANO-MELO, A. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; LIMA-FILHO, J. M.; MELO, N. F. & MAIA, L. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, **9**: 119-123. 1999.
- YORDANOV, I.; VELIKOVA, V. & TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimations and stress tolerance. **Photosynthetica**, **38(1)**: 171-186, 2000.
- ZULLO, M. A. T.; RAMOS, M. T. B.; MONTEIRO, D. A. & GODOY JR, G. Extração e isolamento de diosgenina de barbasco. **Bragantina**, **46(1)**: 9-15, 1987.